



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE
QSAR PARA DERIVADOS DO (-)-BORNEOL CONTRA
LARVAS DE *Aedes aegypti***

ULISSES NICOLA MARTINS

São Cristóvão
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE
QSAR PARA DERIVADOS DO (-)-BORNEOL CONTRA
LARVAS DE *Aedes aegypti***

ULISSES NICOLA MARTINS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti
Linha de Pesquisa: Química e Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos

São Cristóvão
2016

	<p>Martins, Ulisses Nicola. SÍNTESE E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE QSAR PARA DERIVADOS DO (-)-BORNEOL CONTRA LARVAS DE Aedes aegypti. 2016.</p>
--	--

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M386s Martins, Ulisses Nicola
Síntese e desenvolvimento de um modelo de QSAR para derivados do (-)-Borneol contra larvas de *Aedes aegypti* / Ulisses Nicola Martins ; orientador Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti. – São Cristovão, 2016.
89 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. *Aedes aegypti*. 2. Larvicidas. 3. Borneol. I. Cavalcanti, Sócrates Cabral de Holanda, orient. II. Título.

CDU 615.285.7

ULISSES NICOLA MARTINS

**SÍNTESE E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE
QSAR PARA DERIVADOS DO (-)-BORNEOL CONTRA
LARVAS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Professor Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti

1º Examinador: Professora Dr^a. Roseli La Corte dos Santos

2º Examinador: Professor Dr. José Guedes de Sena Filho

PARECER

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por sempre iluminar meu caminho, dando força e sabedoria para seguir em frente nos momentos difíceis desta caminhada.

A minha família, especialmente minha mãe Luz que sempre investiu e acreditou em mim. Te amo.

A todos professores e amigos que me motivaram através de palavras, exemplos e ações. Desde Prof. Damião e Prof. Elisdete que com suas palavras amigas me fizeram acreditar que este sonho era possível. A Emily que organizou minha inscrição no processo seletivo. A UFS, aos professores e colegas do PPGCF pela oportunidade de compartilhar seu conhecimento comigo ao longo do mestrado.

Obrigado Prof. Francilene e família de amigos do NuPPNaF, agradeço demais o apoio e convivência com vocês, sentirei saudades de todas as transfiníssimas.

A Prof. Kamila e Prof. Eduardo pela grande amizade e incentivo, não tenho palavras para expressar corretamente minha gratidão. A enorme bagagem adquirida através da convivência com vocês será levada comigo para sempre, com muito carinho.

Ao Pró-reitor de pesquisa e pós-graduação Prof. Marcus Eugênio e aos companheiros de APG por toda força e luta a favor da ciência, tecnologia e inovação tanto na UFS quanto no Brasil.

A Prof^a Roseli La Corte pela cessão das larvas, ao Prof. Norberto Peoporine Lopes pela análise EM, e ao Prof. Emmanoel Vilaça pelo RMN ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados.

A toda equipe do LQF, especialmente ao meu orientador Prof. Sócrates que teve a generosidade e paciência de me aceitar como aluno de mestrado. Obrigado por acreditar em mim.

A CAPES pelo apoio financeiro

*“Nos campos da observação, o acaso
favorece apenas as mentes preparadas”*

Louis Pasteur

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal transmissor de doenças de origem viral, como a dengue, chikungunya e zika. Na ausência de recursos específicos como a falta de vacinas e medicamentos eficazes, a principal estratégia para o manejo destas infecções se dá pelo controle do vetor. Os principais agentes utilizados no controle químico são os organofosforados e piretroides, contudo o seu uso indiscriminado fez surgir populações do *Ae. aegypti* resistentes. Uma alternativa viável a estes inseticidas/larvicidas clássicos é a pesquisa de moléculas fitoquímicas, como as da classe dos terpenoides, presentes nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais que já possuem atividade larvicida documentada na literatura. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e avaliar a atividade do monoterpene (-)-borneol e seus doze derivados frente as larvas do *Ae. aegypti*, utilizando o QSAR como estratégia de descoberta de novos candidatos a agentes larvicidas. Através da reação de esterificação em meio básico, utilizando cloreto de ácido, o (-)-borneol foi modificado a partir de sua hidroxila alcoólica, variando no tamanho e tipo de cadeia lateral. Os compostos sintetizados foram purificados em coluna cromatográfica e caracterizados por RMN ^{13}C e ^1H , EM, e IR. A CL_{50} foi avaliada através do ensaio larvicida, onde a cada teste 20 larvas em terceiro estágio são expostas por 24h a diferentes concentrações (em triplicata) de composto. A partir dos dados de mortalidade das larvas, a CL_{50} é obtida com IC 95% pela análise Probit. O derivado cloroacetato de bornila exibiu a maior atividade (21 ppm), já o heptanoato de bornila demonstrou-se inativo. As propriedades físico-químicas dos derivados foram obtidas pelo módulo GAMESS® do programa Chem3D Ultra 7.0® a partir da conformação mais estável da molécula. O descritor escolhido para estudo de QSAR foi o Log P, por apresentar a melhor correlação, e principalmente por ser um parâmetro altamente informativo quanto a sua influência na atividade larvicida. A equação foi calculada pelo software MiniTab16™ através da regressão linear entre o Log P dos derivados e a atividade larvicida expressa em $\text{Log}(1/\text{CL}_{50})$. O QSAR obtido sem os compostos *outliers* apresentou índices de qualidade de $r^2 = 0,944$; $F = 58,71$; $q^2 = 0,8442$; $S_{\text{PRESS}} = 0,0827$ indicando alta preditibilidade do modelo. Foi observada a influência da lipofilicidade na atividade larvicida dos derivados do (-)-borneol, sugerindo que moléculas com Log P de aproximadamente 4,5 tem sua atividade otimizada. Este trabalho poderá ser utilizado como base para direcionar o planejamento de novos candidatos a agentes larvicidas.

Palavras chave: *Aedes aegypti*, QSAR, borneol

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main transmitter of vector-borne diseases such, dengue, chikungunya and zika. Hence no vaccine exists as well as drugs to reduce viremia, major strategy to prevent these diseases is controlling vector spreading. The main larvicides used are organophosphates and pyrethroids, however the indiscriminate use of these compounds gave rise *Ae. aegypti* resistant strains. A viable alternative to classic insecticides / larvicides is the phytochemical research of molecules, like terpenoids, component of essential oils of several plants that exhibits larvicidal activity. In this context, the aim of this study was synthesize and evaluate the activity of monoterpene (-)-borneol and twelve derivatives against *Ae. aegypti* larvae, using QSAR as strategy for discovery of new larvicidal agents. Reactions were carried out by esterification with acid chloride in basic medium, (-)-borneol was modified in hydroxyl group, changing size and type of the side chain. Compounds synthesized were purified in column chromatography and characterized by NMR ^{13}C , ^1H , MS and IR. LC_{50} was evaluated through larvicidal assay, in each test, twenty third instar larvae were exposed to various concentrations of derivatives to 24h. From mortality data obtained, LC_{50} was determined through Probit analysis. The bornylchloroacetate derivative exhibited the best activity (21 ppm), but bornyl heptanoate showed no activity. The physicochemical properties of the derivatives were obtained by GAMESS® module Chem3D Ultra 7.0® software from most stable conformation of the molecule. Descriptor chosen for QSAR study was Log P, since best correlation obtained and especially to be a highly informative parameter to measure influence on the larvicidal activity. Equation was obtained by MiniTab16™ software by linear regression between derivatives Log P, and the activity expressed in $\log(1/\text{LC}_{50})$. QSAR equation without outliers exhibited quality indexes of $r^2 = 0.944$; $F = 58.71$; $q^2 = 0.8442$; $\text{Spre} = 0.0827$, indicating high predictability of the model. It was observed influence of lipophilicity on (-)-borneol derivatives larvicidal activity, suggesting that molecules with Log P value around 4.5 have optimized activity. This study may be used as a basis to guide research of new larvicides candidates.

Key words: *Aedes aegypti*, QSAR, borneol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 O VETOR <i>Aedes Aegypti</i>	4
2.2 EPIDEMIOLOGIA	5
2.2.1 Epidemiologia da Dengue	6
2.2.2 Epidemiologia da Chikungunya	8
2.2.3 Epidemiologia da Zika	10
2.2.4 Microcefalia relacionada ao vírus Zika	12
2.4 RESISTENCIA E PERSPECTIVAS DE CONTROLE AO VETOR	16
2.5 BORNEOL E A ATIVIDADE LARVICIDA.....	19
2.6 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DO (-)-BORNEOL	20
2.7 INTRODUÇÃO AO QSAR	21
2.7.1 Descritores estruturais de caráter lipofílico	22
2.7.2 Descritores estruturais de caráter eletrônico.....	24
2.7.3 Descritores estruturais de caráter estérico.....	25
2.7.4 Outros descritores de propriedades físico-químicas	26
2.8 QSAR NA PESQUISA DE AGENTES DE CONTROLE DE INSETOS.....	28
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 GERAL.....	33
3.2 ESPECÍFICOS	33
4. EXPERIMENTAL	34
4.1. ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	34
4.1.1. Aparelhos utilizados:	34
4.1.2 Substâncias, reagentes e outros materiais utilizados:.....	34
4.1.3. Métodos Cromatográficos	35
4.1.4. Métodos Espectrométricos	36
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS	38
4.2.1 Acetato de bornila (2)	39
4.2.2 Propanoato de bornila (3)	40
4.2.3 Butanoato de bornila (4)	40
4.2.5 Hexanoato de bornila (6)	41
4.2.6 Heptanoato de bornila (7)	42
4.2.7 Benzoato de bornila (8)	42
4.2.8 Isobutirato de bornila (9)	42
4.2.9 Pivaloato de bornila (10)	43
4.2.10 Isovaleroato de bornila (11)	43
4.2.11 Cloroacetato de bornila (12)	44
4.2.12 Tricloroacetato de bornila (13)	44

4.3 PROCEDIMENTOS PARA TESTES LARVICIDAS	47
4.3.1 Produção das larvas.....	47
4.3.2 Preparo da solução-estoque	47
4.3.3 Realização do teste larvicida.....	47
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.5 ESTUDO DE QSAR	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS	50
5.2 ATIVIDADE LARVICIDA	52
5.2 SAR.....	53
5.3 QSAR.....	55
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: (-)-borneol	2
Figura 2: Probabilidade de ocorrência do <i>Ae. aegypti</i> no mundo (Kraemer et al., 2015).	4
Figura 3: Estágios do ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i> (Funasa, 2001).	5
Figura 4: Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica do início dos sintomas no Brasil em 2013, 2014 e 2015.	7
Figura 5: Casos notificados e confirmados de febre de chikungunya por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 18 (Brasil, 2016b).	10
Figura 6: Taxa de incidência (/100 mil hab.) de febre pelo vírus Zika por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 16 (Brasil, 2016) *.	11
Figura 7: Distribuição espacial com casos confirmados de microcefalia e/ou alteração do SNC, Brasil, até a SE 21/2016. (Brasil, 2016c)	14
Figura 8: Biossíntese do borneol e da cânfora no metabolismo secundário de plantas (Croteau e Karp, 1977).	19
Figura 9: Mecanismo simplificado da reação de esterificação do borneol.	38
Figura 10: (-)-borneol e derivados sintetizados	46
Figura 11: Ensaio larvicida.	48
Figura 12: Mecanismo da reação	51
Figura 13: Hidrólise do cloroacetato de bornila em borneol e íon cloroacetato	54
Figura 14: Ânion cloroacetato estabilizado pelo efeito retirador de elétrons do cloro (Solomons & Fryhle, 2008).	55
Figura 15: Modelo parabólico de Hansch (Tavares, 2008)	56
Figura 16: Correlação de duas variáveis: Log P x Pressão Crítica, $r^2 = 0,889$.	56
Figura 17: Análise de regressão da atividade larvicida VS coeficiente de partição	60
Figura 18: Análise de regressão da atividade larvicida VS coeficiente de partição sem compostos outliers.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas mais comumente associadas a Dengue, Chikungunya e Zika (Pinto-Junior et al, 2015).....	12
Tabela 2: Atividade larvícida do borneol e seus derivados frente as larvas do <i>Ae. aegypti</i>	52
Tabela 3: Descritores estruturais mais relevantes no estudo do QSAR da atividade larvícida do borneol frente larvas de <i>Ae. aegypti</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE – Acetilcolinesterase

Ae – *Aedes*

AMC – Área Molecular de Connolly

CC – Cromatografia em coluna

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

CCE – carboxi/colinesterases

CEPA – Comitê de Ética de Pesquisas em Animais

CHIKV - Denominação atribuída ao vírus da febre chikungunya

CL₅₀ – Concentração letal que mata 50% da população em estudo

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

COSY - *Homonuclear Correlation Spectroscopy*

DCM - Diclorometano

DDT - dicloro-difenil-tricloroetano

DENV – Denominação atribuída aos sorotipos do vírus da dengue

DMAP - 4-dimetilaminopiridina

EM – Espectrometria de massas

ESI – ionização por “electrospray”

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IC – Intervalo de confiança

IGR- Regulador do crescimento de insetos

IOL – Linhagem do Oceano Índico

IPP - isopentil difosfato

IR – Infravermelho

Log P – logaritmo do coeficiente de partição 1-octanol/água

LOO – *Leave One Out*

MHz - Megahertz

MR – Refratividade molar

MS – Ministério da Saúde

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo

OMS – Organização Mundial de Saúde

ppm – Parte por milhão

QSAR – Relação estrutura-atividade quantitativa

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SAR – Relação estrutura-atividade

SE – Semana epidemiológica

SI – Sistema Internacional

TMS – Tetrametilsilano

UFS – Universidade Federal de Sergipe

UV – Ultravioleta

Vw – Volume de Van der Waals

ZIKV – Denominação atribuída ao vírus da febre zika

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de diversas arboviroses mundialmente importantes, como a dengue (Simmons *et al.*, 2012), febre amarela (Jentes *et al.*, 2011), chikungunya (Weaver, 2014) e o zika (Campos *et al.*, 2015). As mosquito fêmeas são eficientes transmissoras destas doenças, pois se alimentam de sangue humano para obter os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos seus ovos, uma fêmea se alimenta de diversos hospedeiros ao longo de sua vida (Liesch *et al.*, 2013).

As infecções pelo vírus da dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) foram um problema de saúde pública crescente nestes últimos 50 anos. Ambas as infecções causam febres altas, fortes dores articulares e sintomas como o da gripe. Estima-se que metade da população mundial esteja em risco de infecção por dengue, enquanto a chikungunya que estava limitada a África e a Ásia, em 2015 estava notificada na Europa, Caribe e América do Sul (Kraemer *et al.*, 2015).

No Brasil, entre novembro de 2014 e início de 2015 uma epidemia de doença exantemática acompanhada de febre baixa, artralgia e conjuntivite foi identificada por infectologistas como sendo causada pelo zika vírus (ZIKV) (Brito, 2015). Além das epidemias explosivas determinadas por esses três arbovírus, um crescente aumento de formas graves e atípicas tem sido observado. Destacam-se registros de manifestações neurológicas (síndrome de Guillain-Barré) e microcefalias, potencialmente associadas ao vírus Zika (Brasil, 2016a).

Com a exceção da febre amarela, não existem vacinas operacionais eficazes ou tratamentos específicos para as outras doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti* (Devillers *et al.*, 2014); (Crunkhorn, 2015); (Rajapakse *et al.*, 2012), a estratégia é a redução do contato homem-vetor através do controle do *Ae. aegypti* (Brasil, 2014b). A aplicação de inseticidas da classe dos organofosforados e piretróides ainda são a medida mais utilizada pelos programas de saúde pública. Além de serem tóxicos, após sucessivas

aplicações destes compostos houve surgimento de populações resistentes (Montella *et al.*, 2007).

Na busca por agentes larvicidas alternativos, seguros ao meio ambiente e aos mamíferos, que sejam efetivos contra as populações resistentes aos organofosforados, os compostos de origem vegetal surgem como alternativa promissora no combate do mosquito *Ae. aegypti* (Garcez *et al.*, 2013).

A co-evolução de plantas e insetos levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa em algumas espécies vegetais. Os metabólitos secundários responsáveis por este efeito são majoritariamente da classe dos terpenoides presentes nos óleos essenciais (Dias e Moraes, 2014). As moléculas fitoquímicas podem ser utilizadas para maximizar a eficácia e especificidade de agentes larvicidas/inseticidas, assim propondo um *design* que atue em específicos ou múltiplos mecanismos, ao mesmo tempo que mantém a sustentabilidade econômica e ambiental (Rattan, 2010).

Apesar da necessidade de novos larvicidas/inseticidas, poucos produtos são desenvolvidos e comercializados, isto se deve pelo alto custo do investimento e pela “baixa lucratividade” do mercado de controle de vetores. Felizmente, o uso de técnicas *in silico*, como a Relação Estrutura Atividade Quantitativa (QSAR), pode reduzir o tempo e o custo deste processo. A partir de testes da atividade biológica é possível avaliar as características estruturais e físico-químicas que explicam sua atividade (Devillers *et al.*, 2014).

O composto Endo-(1S)-1,7,7-trimethylbicyclic[2.2.1]heptan-2-ol ou (-)-borneol ($C_{10}H_{18}O$) (Figura 1) é um monoterpene bicíclico (Silva-Filho *et al.*, 2012) presente em inúmeras espécies de plantas com atividade larvicida, tais como *Albizzia amara*, *Ocimum basilicum*, *Thymus satureoides*, *Thymus vulgaris*, *Clausena dentata*, (Pavela, 2009; Murugan *et al.*, 2007; Rajkumar e

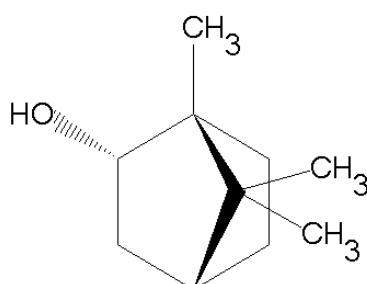


Figura 1: (-)-borneol

Jebanesan, 2010).

Já que é um monoterpeno, presente no óleo essencial de plantas com atividade larvícida, e que possui uma hidroxila disponível para modificações químicas, foi de interesse sintetizar, caracterizar, e testar a atividade biológica de derivados do (-)-borneol para realizar o estudo de QSAR.

Sendo assim, foram sintetizados doze derivados do (-)-borneol através de reação de esterificação em meio básico, segundo metodologias adaptadas de Matos e Andrade (2008), e Devlin *et al* (2005). A concentração para a qual morrem 50% larvas de *Ae. aegypti* no 3º estágio (CL₅₀) após 24h de exposição ao composto foi obtida através de metodologia descrita por Santos *et al.* (2011).

A partir destes dados foi possível realizar um estudo de QSAR correlacionando os valores de CL₅₀ e as propriedades físico-químicas das moléculas sintetizadas para obter equações matemáticas que expliquem a atividade observada no modelo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O VETOR *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é uma espécie tropical e subtropical, de distribuição cosmopolita, encontrado entre as latitudes 35°N e 35°S (figura 2) e é limitada pela altitude, sendo incomum acima dos 1.000 metros. Por sua estreita associação com o homem, o *Ae. aegypti* é, essencialmente um mosquito urbano, encontrado em maior abundância em cidades, vilas e povoados. O seu ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvários), pupa e mosquito adulto (Funasa, 2001).

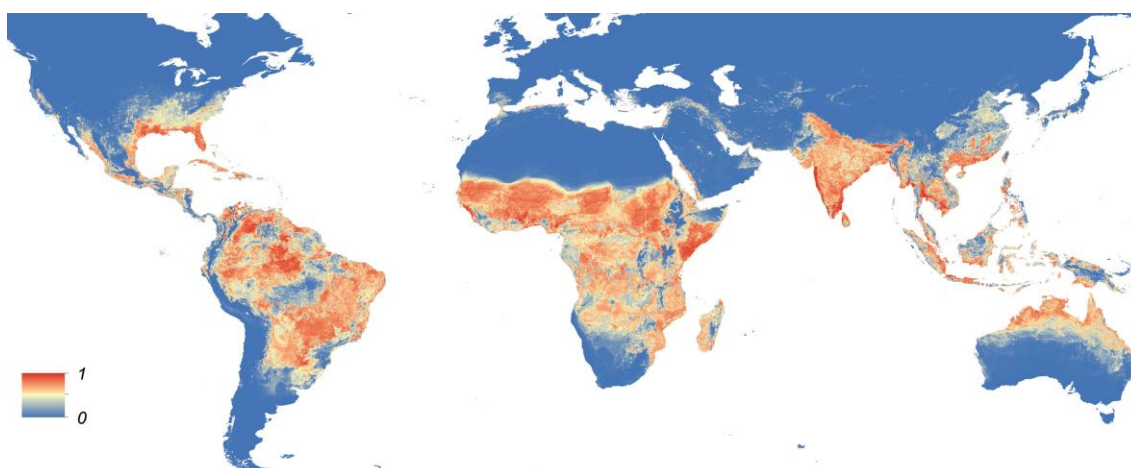


Figura 2: Probabilidade de ocorrência do *Ae. aegypti* no mundo (Kraemer *et al.*, 2015).

Após a fecundação, o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas. Uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano. A capacidade de resistência dos ovos à dessecação é um desafio para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva) (Funasa, 2001).

O *Ae. aegypti* é um inseto holometabólico, as larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos depósitos. As larvas possuem quatro estádios

evolutivos onde sua duração depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder cinco dias. Em baixas

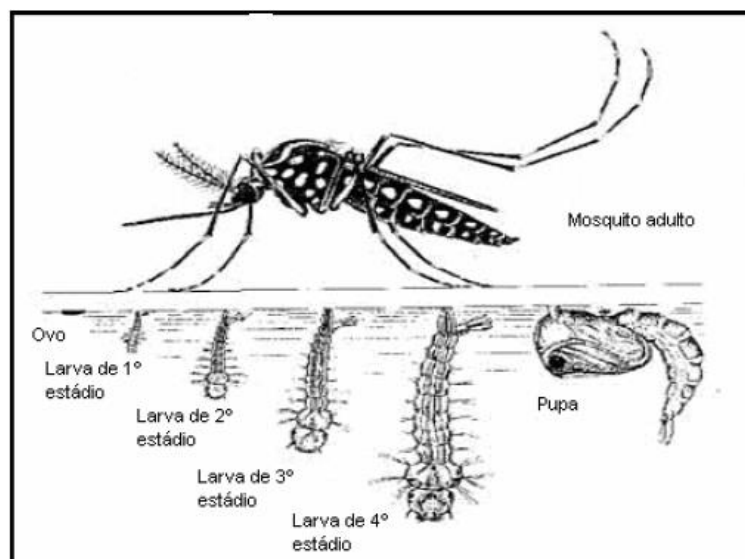


Figura 3: Estágios do ciclo de vida do *Ae. aegypti* (Funasa, 2001).

temperaturas e escassez de alimento, o 4º estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes do estágio pupal que dura aproximadamente três dias (Funasa, 2001).

Dentro de 24 horas após virar mosquito adulto, os mosquitos podem acasalar (Funasa, 2001). Se infectada, a fêmea do *Ae. aegypti* permanece desta forma por toda a sua vida, mesmo depois de repetidos repastos em humanos (Donalísio e Glasser, 2002). Quando o *Ae. aegypti* está infectado pelo vírus da dengue ou da febre amarela, pode haver transmissão transovariana destes, de maneira que, em variável percentual, as fêmeas filhas de um espécime portador nascem já infectadas (Aitken *et al.*, 1979; Rosen *et al.*, 1983), já para o CHIKV a transmissão não foi observada (Mourya, 1987).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O *Ae. aegypti* acha-se disseminado em todos os Estados brasileiros, onde as populações do inseto são altamente susceptíveis aos vírus da dengue e febre amarela (Lourenco-De-Oliveira *et al.*, 2004). Além destes vírus, em outubro de 2014 já haviam sido notificados aproximadamente 1000 casos da

febre chikungunya, causada por infecção pelo chikungunya vírus (CHIKV) (Azevedo Rdo *et al.*, 2015). Em março de 2015, no estado da Bahia, foram coletadas amostras de casos suspeitos de infecção por Zika vírus (ZIKV), o que foi confirmado posteriormente (Campos *et al.*, 2015). Todas estas doenças são transmitidas pelo mesmo mosquito vetor, o *Ae.aegypti*.

2.2.1 Epidemiologia da Dengue

A dengue como doença endêmica ou pandêmica reemergente, ocorre praticamente em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta (Da Silva-Voorham *et al.*, 2009). Estas regiões são vulneráveis a grandes epidemias devido diversos aspectos, tais como: mudanças globais, alterações climáticas, variabilidade do clima, uso da terra, armazenamento de água e irrigação, crescimento da população humana e urbanização (Sutherst, 2004).

Estes fatores contribuem expressivamente para a proliferação e desenvolvimento do *Ae. aegypti*. Estima-se que 50 milhões de infecções ocorram por ano atingindo aproximadamente 100 países (Simmons *et al.*, 2012). As alterações climáticas elevam em mais de 2 bilhões o número de pessoas expostas a dengue e as projeções para 2085 sugerem que cerca de 5 a 6 bilhões de pessoas (50 a 60 % da população global) estarão em risco de transmissão da doença (Hales *et al.*, 2002; Viana e Ignotti, 2013).

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, a mesma da febre amarela e da zika. Os *Flavivirus* são relativamente pequenos (40 – 50 nm) e esféricos com envelope lipídico, o seu genoma é composto por aproximadamente 11000 bases e possui três proteínas estruturais e sete não estruturais. Existem 4 sorotipos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler, 1998; Shan *et al.*, 2016).

Todos os *Flavivirus* possuem um grupo comum de epítomos na proteína do envelope, ocorrendo reação cruzada nos testes sorológicos. A infecção com um sorotipo de dengue fornece imunidade vitalícia para esse vírus, mas não há nenhuma proteção cruzada ou imunidade para os outros sorotipos. Pessoas que vivem numa área endêmica de dengue podem ser infectadas com os quatro sorotipos, durante a sua vida (Gubler, 1998).

Contabilizando o ano de 2013 foram notificados 1,4 milhão de casos prováveis de dengue no País em decorrência de uma circulação do DENV-4, já que a maioria dos brasileiros não tinha imunidade contra ele. O DENV-4 respondeu por 60% dos casos (Brasil, 2014).

No ano de 2014 o Brasil começou a adotar a nova classificação de casos de dengue da Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo estes atualmente classificados como dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Por essa razão, não é possível a comparação direta dos casos graves com o ano de 2013, tendo em vista que anteriormente adotavam-se as seguintes classificações: febre hemorrágica da dengue, síndrome do choque da dengue e dengue com complicações. Foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue em 2014. Nos meses de janeiro a julho, 11.798 amostras foram enviadas para realização do exame de isolamento viral, sendo 3.714 positivos (31,5%). O sorotipo predominante foi o DENV1 (82%), seguido de DENV4 (16,1%) (Brasil, 2015a).

Em 2015 (04/01/2015 a 02/01/2016), 1.649.008 casos prováveis de dengue no país foram registrados. O pico da incidência ocorreu no mês de abril (229,7 casos/100 mil habitantes), seguido de uma redução no mês de maio. Esta diminuição dos casos é observada nos meses subsequentes até outubro, a partir de novembro observa-se então uma leve tendência de aumento (figura 4). Através da realização do exame de isolamento viral, foi possível identificar os sorotipos predominantes daquele ano. Das 23.976 amostras enviadas houve 9.429 resultados positivos (39,3%), sendo estas identificadas como DENV1 (94,1%), seguido de DENV4 (4,8%), DENV2 (0,7%) e DENV3 (0,4%). (Brasil,

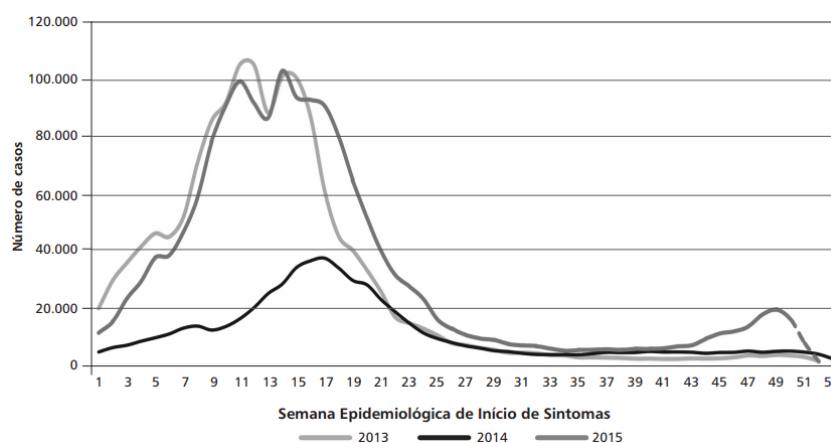


Figura 4: Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica do início dos sintomas no Brasil em 2013, 2014 e 2015 (Brasil, 2015c).

2016a).

Em 2016, foram registrados 1.182.250 casos prováveis de dengue no país até a Semana Epidemiológica (SE) 18 (3/1/2016 a 7/5/2016). Foram confirmados 240 óbitos por dengue, o que representa uma redução no país de 63% em comparação com o mesmo período de 2015, quando foram confirmados 655 óbitos. Das 4.901 amostras enviadas para isolamento do vírus da dengue, destas, 1.682 foram positivas, sendo 93,2% positivas para o sorotipo viral DENV1 (Brasil, 2016b).

Analisando os sorotipos predominantes ao longo dos últimos anos, observamos que no ano de 2013 predominou o sorotipo DENV4 no Brasil (60% dos casos), enquanto nos anos de 2014 e 2015 houve uma reinfestação com o sorotipo DENV-1, em 2016 o DENV-1 predomina com 93,2% das amostras positivas analisadas até a SE 18 (Brasil, 2015; Brasil, 2016b).

2.2.2 Epidemiologia da Chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV) é um alphavirus re-emergente da família *Togaviridae*, transmitido por mosquitos que levanta um problema significativo de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais. Normalmente a infecção por CHIKV é transmitida entre humanos pelos vetores antropofílicos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Nunes *et al.*, 2015).

Quatro genótipos CHIKV foram identificados desde a sua descoberta em 1952. Genótipos do Centro-Leste-Sul-africanos e do Oeste Africano são endêmicas e causaram epidemias na África sub-saariana, ao passo que o genótipo asiático circula em centros urbanos no Sudeste Asiático por ciclo de transmissão *Ae. aegypti*-humano. A linhagem do Oceano Índico (IOL) causou epidemias explosivas em ilhas do Oceano Índico e Ásia entre 2005 e 2011. Várias cepas IOL possuem mutações que aumentam a infectividade e transmissibilidade no *Ae. albopictus* (Nunes *et al.*, 2015).

Mutações das cepas IOL desencadearam estas epidemias pela capacidade deste vírus usar tanto o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* como vetores. O resultado foram milhares de infecções, isto porque o *Ae. albopictus* pode

sobreviver ao frio do inverno e é geralmente menos adaptado para habitats urbanos do que *Ae. aegypti*. A cepa CHIKV-IOL adaptada para este vetor circula tanto em climas temperados tais como a Itália, e em habitats rurais, onde a espécie é mais comum que a segunda (Weaver, 2014).

As Américas, especialmente o Brasil que possui ambos os vetores, acabou recebendo muitos turistas infectados durante as epidemias em curso de CHIK-IOL. Inevitavelmente a chikungunya chega ao novo mundo, estas foram as principais razões levantadas para as epidemias do Caribe e América Latina (Weaver, 2014).

Em 05 de dezembro de 2013, as infecções do genótipo CHIKV asiáticos foram relatados na ilha caribenha de Saint Martin. Pela primeira vez na história registrada, CHIKV tinha estabelecido um ciclo mosquito-humano nas Américas. A partir de 31 de outubro de 2014 mais de 1.222.000 casos suspeitos de CHIKV foram notificados nas Américas e infecções autóctones foram confirmadas em 50 territórios na região (Nunes *et al.*, 2015). No Brasil, foi confirmada a sua presença no município do Oiapoque (AP) (Donalisio e Freitas, 2015).

Em 2014 (SE 37 a 53), foram notificados 3.657 casos autóctones, ou seja, de pessoas sem registro de viagem para países com transmissão da doença, como República Dominicana, Haiti, Venezuela e Ilhas do Caribe. Os casos foram registrados nos estados do Amapá, Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Roraima (Brasil, 2015). Em 2015, foram notificados no país 38.332 casos prováveis de febre de Chikungunya. Em 2016, até SE 18, foram notificados 83.678 casos prováveis de febre de chikungunya distribuídos em 1.550 municípios (figura 5); destes, 15.053 casos foram confirmados (Brasil, 2016b).

Comparando com a dengue, a Chikungunya apresenta características que potencializam a disseminação da doença e aumentam o risco de grandes e explosivas epidemias. Entre estas características estão a maior proporção de casos sintomáticos (> 90%), menor tempo de incubação intrínseca (de 2 a 7 dias), maior período de viremia (2 antes e 10 depois da febre) e menor período de incubação extrínseca (no mosquito). (Donalisio e Freitas, 2015)

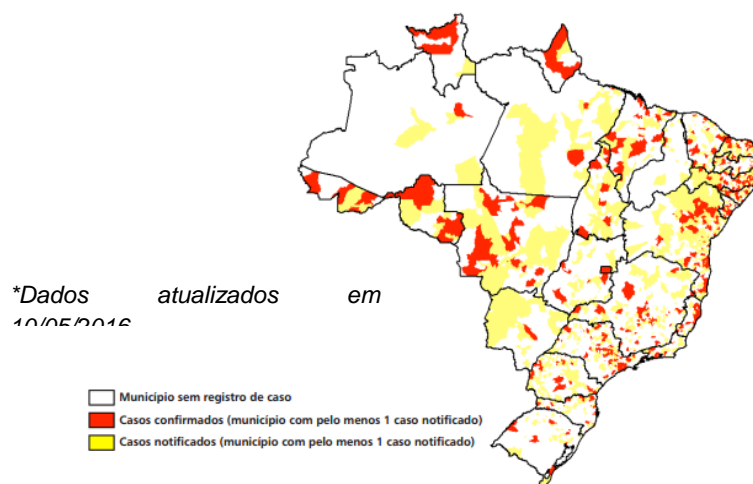


Figura 5: Casos notificados e confirmados de febre de chikungunya por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 18 (Brasil, 2016b).

A replicação viral no mosquito *Ae. albopictus* além do *Ae. aegypti* aumenta a extensão geográfica das regiões com potencial de circulação viral. Existe, ainda, o risco de estabelecimento de um ciclo enzoótico da Chikungunya macaco-mosquito no Brasil impossibilitando a erradicação da doença no país (Donalisio e Freitas, 2015).

2.2.3 Epidemiologia da Zika

O vírus foi isolado pela primeira vez em 1947 nas florestas Zika (Uganda), em um macaco *Rhesus*, durante um estudo sobre a transmissão da febre amarela silvestre. Embora a infecção em seres humanos foi somente demonstrada por estudos sorológicos em 1952 (Uganda e Tanzânia), apenas em 1968 o vírus foi isolado a partir de amostras humanas na Nigéria. (OPAS, 2015).

O primeiro surto de infecção pelo vírus Zika fora da África ocorreu em 2007 na ilha de Yap (Micronésia). Os médicos desta ilha notaram uma epidemia caracterizada por *rash*, conjuntivite, febre, artralgia, e artrite. Embora três pacientes apresentaram sorologia positiva no teste de IgM para dengue, eles suspeitaram que aquela doença era diferente da dengue. Dos 185 casos suspeitos que foram notificados, 49 foram confirmados, e 59 foram consideradas prováveis. O surto durou 13 semanas (abril-julho) (Duffy *et al.*, 2009). Posteriormente, um surto ocorreu na Polinésia Francesa, que começou

no final de outubro de 2013 e registrou-se cerca de 10.000 casos, sendo que 70 destes foram graves com complicações neurológicas (síndrome de Guillain Barre, meningoencefalite) ou auto-imunes (púrpura trombocitopênica, leucopenia) (Cao-Lormeau *et al.*, 2014).

Uma investigação foi realizada para determinar a associação entre estas complicações e infecções secundárias por outro flavivírus, especialmente o vírus da dengue. Em 2014, também foram registrados casos em Nova Caledônia e Ilhas Cook (Cao-Lormeau *et al.*, 2014). Em março de 2015 no município de Camaçari (BA), foi coletado o soro de 24 pacientes com sintomas de *rash* maculopapular, febre, mialgia/artralgia, e conjuntivite. Através da técnica de RT-PCR foi realizado diagnóstico diferencial onde 7 pacientes tiveram confirmação de infecção pelo ZIKV, e 3 para CHIKV. Confirmou-se a associação entre o ZIKV com a epidemia existente no local. Através desta notificação na Bahia, outros casos foram identificados em outros locais do Brasil (Campos *et al.*, 2015).

Em 2016, até a SE 18, foram notificados 138.108 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país (figura 6) (Brasil, 2016b).

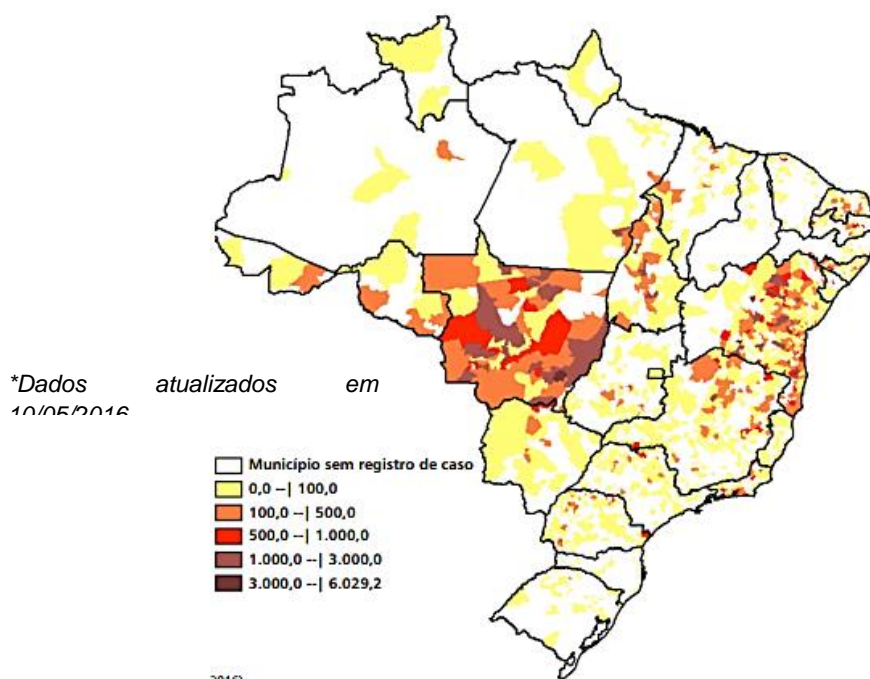


Figura 6: Taxa de incidência (/100 mil hab.) de febre pelo vírus Zika por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 18 (Brasil, 2016) *.

A inclusão de mais doenças entre os diagnósticos clínicos diferenciais para síndromes *dengue like* (similares a dengue) implica um intenso esforço para as equipes de saúde pelo país. A ocorrência de epidemias simultâneas dificulta o manejo clínico devido as peculiaridades de cada doença (tabela1) (Donalisio e Freitas, 2015).

Tabela 1: Manifestações clínicas mais comumente associadas a Dengue, Chikungunya e Zika (Pinto-Junior et al, 2016).

SINTOMA	DENGUE	CHIKUNGUNYA	ZIKA
<i>Febre (intensidade)</i>	+++	++	+
<i>Mialgia</i>	+++	++	+
<i>Exantema</i>	+	++	+++
<i>Atralgia</i>	+/-	+++	+
<i>Cefaléia</i>	+++	+	+
<i>Conjuntivite</i>	-	++	+++
<i>Sangramento</i>	++	+/-	-
<i>Choque</i>	+++	+/-	-
<i>Trombocitopenia</i>	+++	+/-	+/-
<i>Neutropenia</i>	++	+	ND
<i>Linfopenia</i>	++	+++	ND

+ (pouco associado); ++ (associado); +++ (frequentemente associado); +/- (pode estar ou não associado), ND (não descrito).

2.2.4 Microcefalia relacionada ao vírus Zika

No final de outubro de 2015, a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco notificou 26 casos de microcefalia. Devido a raridade do evento e considerando o perfil clínico e epidemiológico da doença no Estado, foi solicitado apoio ao Ministério da Saúde para complementar as investigações iniciais (Brasil, 2015b).

A principal hipótese sob investigação foi a infecção pelo vírus Zika, já que era uma doença emergente nesta região. Um mês depois da primeira notificação ao MS, 646 casos foram notificados somente no estado de Pernambuco (Oliveira Melo *et al.*, 2016). Em fevereiro de 2016 a Organização Mundial de Saúde, declarou que a suspeita entre a microcefalia e a infecção pelo ZIKV constitui Emergência Internacional de Saúde Pública (WHO, 2016). Subsequentemente, pesquisadores da Polinésia Francesa realizaram um estudo epidemiológico retrospectivo de 2013 até 2015 para avaliar os casos de microcefalia durante o surto no país, identificando um aumento na anormalidade em neonatos, incluindo microcefalia (Cauchemez *et al.*, 2016)

O ZIKV demonstrou-se altamente neurotrópico, particularmente infectando células neuronais progenitoras, e em menor grau, células neuronais em todos estágios de maturação podendo interromper a embriogênese, levando a anomalias como a microcefalia (Tang *et al.*, 2016). Diversos estudos isolaram o ZIKV de cérebros e líquido de fetos com microcefalia congênita, sendo também identificado em placenta de mães que tiveram sintomas de Zika durante a gestação (Brasil *et al.*, 2016; Mlakar *et al.*, 2016; Driggers *et al.*, 2016).

Li e colaboradores (2016) realizaram o estudo da infecção do ZIKV em camundongos, onde obtiveram a primeira evidência da relação entre a microcefalia e o ZIKV em mamíferos. A análise da expressão global dos genes nos cérebros infectados revela regulação positiva dos genes dos receptores da entrada de *Flavivirus* e desregulação dos genes envolvidos na resposta imune, apoptose e microcefalia.

A associação espaço-temporal entre os casos de microcefalia e a epidemia de Zika, juntamente com os emergentes relatos de casos e dados epidemiológicos, levou a consenso científico de que o ZIKV está envolvido em más formações congênitas. Além da microcefalia, outras manifestações incluem: desproporção craniofacial, espasticidade, convulsões, irritabilidade e disfunções de dificuldade de alimentação, anormalidades oculares. Estudos de neuroimagem revelaram calcificações, desordens corticais e ventriculomegalia

(Costello *et al.*, 2016; Cauchemez *et al.*, 2016; Rasmussen *et al.*, 2016; Brasil *et al.*, 2016; Mlakar *et al.*, 2016; Driggers *et al.*, 2016).

Esta gama de anormalidades juntamente com a alta relação de casos com infecção pelo ZIKV sugere a presença de uma nova síndrome congênita. O escopo desta síndrome irá expandir conforme novas informações e mais tempo de acompanhamento das crianças afetadas se tornarem disponíveis. A emergência de saúde pública causada pelo ZIKV é distinta devido as consequências para saúde a longo prazo e seu impacto social (Costello *et al.*, 2016).

Até 11 de junho de 2016 (SE 23), 7.936 casos foram notificados segundo as definições do Protocolo de vigilância (recém-nascido, natimorto, abortamento ou feto). Desses, 3.047 (38,4%) casos permanecem em investigação e 4.889 casos foram investigados e classificados, sendo 1.581 confirmados para microcefalia e/ou alteração do SNC sugestivos de infecção congênita e 3.308 descartados. Segundo a distribuição geográfica, todos os 7.936 casos notificados estão distribuídos em 1.467 (26,3%) dos 5.570 municípios brasileiros (figura 7) (Brasil, 2016c).

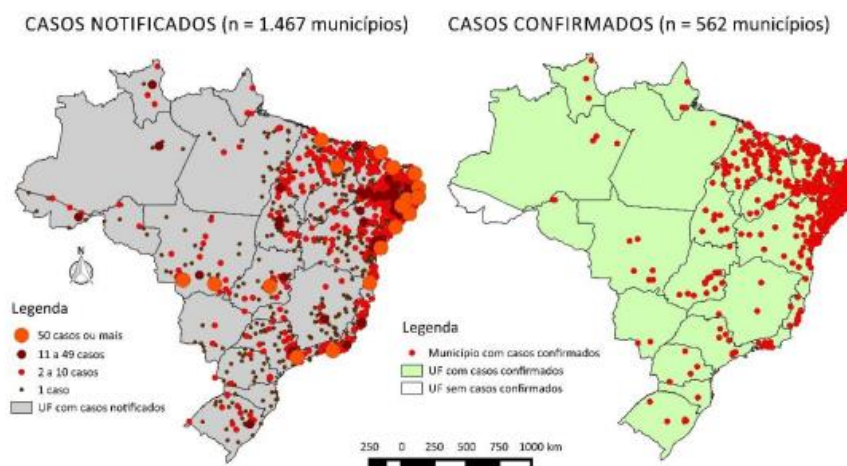


Figura 7: Distribuição espacial com casos confirmados de microcefalia e/ou alteração do SNC, Brasil, até a SE 21/2016. (Brasil, 2016c)

Como não se tem conhecido nenhum tratamento para esta síndrome, será necessário um esforço severo para controlar o mosquito e evitar a propagação da doença para os outros estados brasileiros e América Latina (Oliveira Melo *et al.*, 2016).

2.3 CONTROLE DO VETOR

Ao final do século XIX, verificou-se que certas espécies de insetos eram responsáveis pela transmissão de algumas importantes doenças. Vacinas ou medicamentos efetivos para seu manejo ainda não eram disponíveis e o controle da transmissão era centralizado no combate ao vetor. Atualmente podemos contar com vacinas, caso da febre amarela, ou com medicamentos relativamente eficientes, caso da malária (Braga e Valle, 2007). Entretanto para doenças como a dengue, e as recém-introduzidas no Brasil, Chikungunya e Zika vírus, a situação do século XIX não mudou muito, onde não há tratamentos específicos eficazes, sendo o controle do vetor a medida imprescindível para prevenir estas doenças.

O papel do controle de vetores em Saúde Pública é prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão, e este controle não pode depender de um só método, ele deve dispor de várias alternativas, adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva. Estes componentes de controle integrado de vetores incluem: vigilância, controle ambiental, controle biológico, controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas (Braga e Valle, 2007).

Entretanto, o uso de inseticidas ainda é a maior ferramenta utilizada para o controle do vetor. No momento, os piretróides e os organofosforados são os principais inseticidas neurotóxicos usados no combate ao *Ae. aegypti*. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), outros compostos orgânicos pertencem, principalmente, aos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretróides,

todas essas classes de inseticidas atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos (Braga e Valle, 2007).

Os inseticidas organofosforados, como o Temefós, são amplamente utilizados em Saúde Pública por apresentarem muitas vantagens, como serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. Porém, como principal desvantagem, a instabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação (Palchick, 1996). Além disso, são tóxicos para os vertebrados, mesmo em doses relativamente baixas. Os organofosforados atuam inibindo a enzima acetil colinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de AChE resulta na concentração de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico (Montella *et al.*, 2007).

Outros compostos com mecanismo de ação não descrito, como os *Insect Growth Regulators* (IGRs) podem ser os agentes larvicidas mais promissores no momento (Belinato e Valle, 2015). Os IGRs atuam interferindo no desenvolvimento de insetos imaturos, incluindo nas larvas do mosquito, por exemplo. Demonstraram ser eficazes contra o *Ae. aegypti*, e aparentemente não apresentam ter efeitos nocivos inespecíficos a mamíferos (Lau *et al.*, 2015). Estes compostos suprimem a embriogênese, metamorfose e o surgimento do mosquito adulto (Mulla, 1995). Esta classe de inseticidas compreendem o *pyriproxyfen*, *methoprene*, *diflubenzuron*, *cyromazine* e *novaluron* (Lau *et al.*, 2015).

Dentre os IGRs temos duas classes: os inibidores da síntese de quitina, por exemplo, o Diflubenzuron e Novaluron; e os análogos de crescimento juvenil, como o Pyriproxifen. Estes compostos foram adotados pelo Programa Nacional de Controle a Dengue como larvicida de escolha no combate de populações de *Ae. aegypti*, especialmente as resistentes ao organofosforado Temefós (Belinato e Valle, 2015) (Brasil, 2009).

2.4 RESISTENCIA E PERSPECTIVAS DE CONTROLE AO VETOR

A resistência é uma capacidade genética de um organismo defender-se de um determinado agente tóxico que originalmente era efetivo contra ele, no caso em questão, de um inseto resistir a um determinado inseticida. A resistência ocorre em baixa frequência nas populações naturais, insetos resistentes surgem da seleção exercida através do uso indiscriminado de inseticidas, os quais matam os insetos suscetíveis, selecionando possíveis indivíduos de genes resistentes. Deste modo, deve-se pensar na escolha dos inseticidas utilizados nos programas de controle, assim como o tempo de uso e a sequência de classes dos produtos. Estes são parâmetros fundamentais a serem considerados numa avaliação de suscetibilidade a inseticidas (Macoris, 2011).

A ocorrência cada vez maior de populações de mosquitos resistentes, devido ao uso contínuo de inseticidas sintéticos, além da poluição ambiental e toxicidade para organismos não alvo dos pesticidas comerciais em uso, tem estimulado a procura por métodos alternativos para o controle vetorial. Nesta perspectiva os compostos de origem vegetal surgem como uma estratégia promissora, eficiente e ambientalmente segura para reduzir a população de larvas de mosquitos *Ae. aegypti* (Garcez *et al.*, 2013).

No processo de evolução, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra ataques de insetos, enquanto insetos desenvolveram mecanismos para os superar. A ecologia química estuda como estes compostos (aleloquímicos) estão envolvidos nas interações com organismos entre si e o meio em sua volta. Produtos derivados de plantas, como os óleos essenciais, tem sido estudados para o controle de insetos (Rattan, 2010; López e Pascual-Villalobos, 2010).

Óleos essenciais são uma mistura complexa de metabólitos secundários voláteis que podem ser classificados em: fenilpropanoides ou mono-, sesqui-, e di terpenos. Terpenos são largamente utilizados em alimentos, na indústria farmacêutica e de perfumaria, assim como diversas aplicações farmacológicas, são o maior grupo de produtos naturais em plantas, incluindo óleos essenciais, aromas, fragrâncias e pigmentos lipofílicos. Como são hidrofóbicos, estes compostos são normalmente armazenados nas plantas

em ductos resinosos, células oleosas e nos tricomas glandulares. São derivados de unidades de cinco carbonos chamada de isopreno [$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$]. Os monoterpenos são componentes de óleos essenciais que são formados por duas unidades de isopreno (Rattan, 2010).

Os monoterpenos foram o primeiro grupo químico derivado de plantas considerados como tendo atividade anticolinesterásica, a partir de estudos das interações entre os constituintes voláteis e os insetos. O monoterpeno cíclico pulegona, por exemplo, que é comumente encontrado em óleos de menta, demonstrou-se inibidor da AchE em *Tribolium castaneum*, sendo um componente de defesa da planta (López e Pascual-Villalobos, 2010).

Piccollo (2008) demonstrou que alguns monoterpenóides, dentre eles o borneol, provocaram significativa inibição desta enzima. A AchE tem um importante papel nas sinapses colinérgicas, importantes para os insetos e animais superiores, ao inibir esta enzima, ocorre acúmulo de acetilcolina na membrana pós-sináptica em um estado de permanente estimulação em que resulta em ataxia, falta de coordenação no sistema neuromuscular e morte (Rattan, 2010).

Óleos essenciais e seus constituintes voláteis são amplamente utilizados em prevenção e tratamento de doenças, além disto, é documentado na literatura sua toxicidade aguda contra insetos. Diversos experimentos são descritos para comprovar a eficácia dos óleos essenciais frente diversos mosquitos, entretanto o número de espécies vegetais que possuem óleos essenciais é alto. Destes óleos, os que são mais ricos em fenilpropanóides, sesquiterpenos oxigenados e monoterpenos hidrocarbonados demonstraram maior atividade larvívica contra o *Ae. aegypti* (Pavela, 2009; Dias e Moraes, 2014).

Consta na literatura a atividade larvívica do sesquiterpeno E-nerolidol, isolado da planta *Myroxylon balsamum* (Simas et al., 2004) e já foi comprovado que plantas brasileiras ricas em óleos essenciais contendo sesquiterpenos abundantes como nerolidol e farnesol, monoterpenos como α e β -pineno, carvona, geraniol e fenilpropanóides são boas alternativas no controle das larvas de *Ae. aegypti*. Estudos da atividade larvívica do óleo

essencial da *Lippia sidoides* (Carvalho *et al.*, 2003) e de uma quinona identificada por 2-hidroxi-3-(metil-2-butenil)-1,4 naftoquinona (lapachol) também já foram publicados representando um alto potencial contra as larvas do *Ae. aegypti* (Rodrigues *et al.*, 2005).

2.5 BORNEOL E A ATIVIDADE LARVICIDA

Assim como a cânfora, o (-)-borneol é um monoterpeneo bicíclico encontrado em óleos essenciais de diversas plantas onde pode desempenhar um papel alelopático. Ambos compostos possuem odores penetrantes e são utilizados largamente como agentes flavorizantes e em medicamentos. O (-)-borneol é biosintetizado pelo metabolismo secundário de algumas plantas onde enzimas convertem pirofosfato de geranilo a (-)-borneol, na presença de NAD^+ , e em seguida pode ocorrer a oxidação para conversão a cânfora, conforme demonstrado na Figura 8 (Croteau e Karp, 1977).

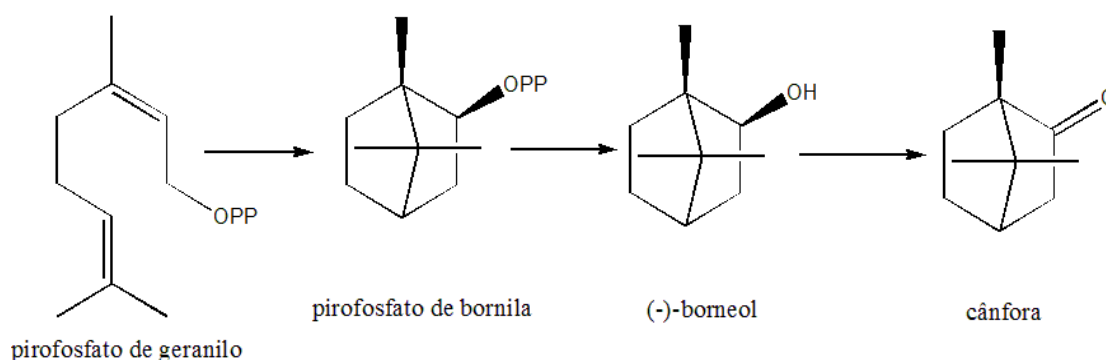


Figura 8: Biossíntese do borneol e da cânfora no metabolismo secundário de plantas (Croteau e Karp, 1977).

Entre os metabólitos secundários de plantas, os terpenoides são o grupo com maior diversidade química. A rota biosintética dos monoterpeneos, sesquiterpeneos e diterpeneos incluem a síntese do precursor C5 isopentil difosfato (IPP), e seu isômero alélico dimetilalil difosfato. A síntese imediata de seus precursores difosfato e a formação dos diversos terpenoides se deve as terpeno sintases que tem papel chave na sua produção (Luo *et al.*, 2007).

Pavela (2009) testou 22 espécies de plantas aromáticas com o objetivo de avaliar a sua atividade larvicida frente ao *Culex quinquefasciatus* vetor

urbano da *Wuchereria bancrofti* (filariose) e dentre os 3 óleos essenciais com melhor atividade larvicida esteve o da *Thymus satureoides* que teve seu componente majoritário o (-)-borneol e o timol (30,3 e 32,5% respectivamente), outra planta testada com alto poder larvicida, a *Thymus vulgaris* também apresentou o (-)-borneol como componente em seu óleo essencial.

Murugan *et al.* (2007) testaram o poder larvicida e repelente de *Albizzia amara* e *Ocimum basilicum* frente ao *Ae. aegypti* e obtiveram bons resultados, atribuindo a substâncias como o (-)-borneol, o poder sinérgico entre o óleo essencial destas duas plantas, já que somente a *O. basilicum* possuía o (-)-borneol nos seus constituintes. Rajkumar (2010) testou o óleo essencial das folhas de *Clausena dentata* frente as larvas de *Ae. aegypti* e verificou que o mesmo possuía significativa atividade larvicida, na caracterização dos compostos majoritários, verificou-se que o (-)-borneol estava presente em quantidade considerável (18,34%) dos componentes deste óleo.

A atividade larvicida e repelente de diversas plantas contendo (-)-borneol já foi testada e avaliada frente a diversas espécies de mosquito que afligem a população humana, assim como podemos observar nos trabalhos de Zhu e Tian, (2011); Pitarokili *et al* (2011); e Cetin (2011).

A atividade biológica dos monoterpenoides é relacionada com seus grupos funcionais, estas dependem da natureza e posição dos grupos funcionais, tanto quanto da configuração espacial, volatilidade e volume molecular. Geralmente derivados de monoterpenóides são mais lipofílicos que seus compostos mãe, o que pode contribuir para sua rápida penetração. A abordagem mais promissora para uso dos monoterpenoides como agentes de controle de vetores consiste na síntese de derivados e análogos através de procedimentos sintéticos simples (Pandey *et al.*, 2013). Neste contexto, o (-)-borneol é uma substância promissora para o estudo da sua modificação sintética com o objetivo de potencializar sua atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti*.

2.6 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DO (-)-BORNEOL

As metodologias para esterificações de álcoois são bastante conhecidas em química orgânica clássica. Entretanto, trabalhos de sínteses envolvendo o

borneol tiveram como objetivo analisar sua conformação levando em consideração sua quiralidade (Devlin *et al.*, 2005; Matos e Andrade, 2008).

Devlin e colaboradores (2005) realizaram a acetilação do (-)-borneol propondo que uma solução de 9 mmol de (-)-borneol em 20 ml de piridina recém destilada fosse adicionada gota a gota em 25 mmol de anidrido acético. Esta mistura é mantida sob agitação contínua por uma noite em temperatura ambiente. Após este tempo, adicionados 20 ml de H₂O, submete-se a agitação vigorosa para então seguir a extração com 20 ml de éter etílico. A fase orgânica é seca com MgSO₄ e o solvente evaporado sob vácuo, o resíduo obtido purificado em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente uma mistura de ciclohexano/acetato de etila (9:1).

Matos e Andrade (2008) propuseram uma síntese de polímeros estáveis de éster do mentol e do (-)-borneol que tem como características ser uma síntese simples em três passos, que mantivesse a atividade óptica destas substâncias e que fossem sintetizados utilizando-se solventes comuns e não agressivos e que a reação ocorresse a temperatura ambiente.

Desta síntese, apenas o primeiro passo foi relevante, que é a fase da produção dos derivados ésteres que foi descrita a seguir: “Em uma solução de 64,0 mmol de (-)-mentol (10,00 g) ou (-)-borneol (9,86 g) em diclorometano seco (50 mL) foram adicionados, sob agitação a 0° C, 83,2 mmol de cloreto de ácido (7,82 g), 83,2 mmol de DCC (17,2 g) e 6,4 mmol de DMAP (0,78 g). A agitação foi continuada durante 12 h à temperatura ambiente. A suspensão será filtrada sob vácuo e lavou-se com diclorometano seco. A fase orgânica foi lavada então com 10% de HCl (50 mL), NaHCO₃ saturado (50 mL) e salmoura (50 mL), secou-se sobre Na₂SO₄, filtrou-se e concentrou-se.”

Através destes dois trabalhos, e pela disponibilidade dos reagentes, foram realizadas as sínteses, tentando-se sempre otimizar o rendimento e aumentar a praticidade da reação, conforme descrito na metodologia.

2.7 INTRODUÇÃO AO QSAR

QSAR é a sigla para *Quantitative Structure Activity Relationship*, ou Relação Estrutura Atividade Quantitativa, em Química Medicinal ou

Farmacêutica, o termo “relação estrutura-atividade” compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto (ligante) pode causar durante o processo de desencadeamento da resposta biológica. Isto envolve todas as etapas, desde sua absorção, distribuição, interação com o receptor e excreção pelo organismo biológico e assim, consequentemente, racionalizar os principais fatores que governam estas interações (Arroio *et al.*, 2010).

Entretanto, as pesquisas na área de QSAR têm como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos análogos. Em geral, esses compostos diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes em posições definidas da estrutura química comum da série. A construção dos modelos requer a elaboração de conjunto ou matriz de dados contendo a medida quantitativa da atividade biológica e os parâmetros físico-químicos capazes de descrever as propriedades dos compostos (Gaudio e Zandonade, 2001).

Entre as propriedades físico-químicas mais importantes para o estabelecimento da atividade biológica de fármacos citam-se a distribuição eletrônica, a lipofilia e a estereoquímica da molécula. Cada uma destas propriedades contribui com maior ou menor intensidade para o estabelecimento da resposta biológica e podem ser representadas por descritores estruturais, que expressam de forma qualitativa e quantitativa a sua influência na bioatividade de compostos químicos (Tavares, 2004).

2.7.1 Descritores estruturais de caráter lipofílico

A atividade de um composto frente a um determinado receptor biológico está intimamente correlacionada com a sua capacidade de absorção, distribuição e solubilização pelas membranas biológicas do organismo em questão, assim sendo, uma molécula tem o poder de interação com o sítio de ação proporcional ao tempo e quantidade que estes permanecem disponíveis para desencadear a respectiva resposta farmacológica (Tavares, 2004).

Devido a lipofilicidade determinar a extensão da absorção, distribuição e excreção de um fármaco, bem como sua interação com o sítio receptor, a lipofilia geralmente está relacionada com a resposta farmacológica provocada.

O entendimento destas etapas corresponde conhecer tanto as características do receptor quanto os parâmetros físico-químicos envolvidos nas estruturas das moléculas envolvidas nos estudos do QSAR. O principal deles se chama coeficiente de partição octanol/água (P). P é definido como a razão entre a concentração das substâncias na fase orgânica (1-octanol) e aquosa (tampão 7,4) em um sistema de dois compartimentos em condições de equilíbrio (equação 1) (Tavares, 2004; Kubinyi *et al.*, 1993).

$$P = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \quad (1)$$

O uso de diferentes solventes, alcanos (inerte), 1-octanol (anfiprótico), clorofórmio (doador de ligação de hidrogênio), e propilenoglicol dipelargonato (PGDP; receptor de ligação de hidrogênio) foram propostos para modelo de diferentes membranas e tecidos, o 1-octanol foi o modelo mais adequado por considerar a característica anfiprótica das membranas. O sistema 1-octanol/tampão fosfato pH 7,4 é considerado o sistema preferencial para a determinação do coeficiente de partição visando sua aplicação em estudo de QSAR. Os valores se dão pelo logaritmo desta razão, sendo então o valor utilizado nos cálculos o Log P e não o P propriamente dito (Tavares, 2004; Kubinyi *et al.*, 1993).

No entanto, a medida experimental de P não é tão fácil quanto deveríamos esperar pela sua simples definição (equação 1). Problemas práticos surgem em moléculas polares ou altamente lipofílicas (Log P > 4), até pequenas impurezas podem distorcer drasticamente os valores experimentais, além de outras diversas variáveis e condições operacionais que dificultam a determinação experimental de P. Uma das contribuições mais importantes de Hansch foi a descoberta que o P é um parâmetro constitutivo aditivo nas moléculas, assim como fez Hammett em sua constante σ . A lipofilia pode ser fatorizada em dois termos:

$$\text{Lipofilia} = \text{hidrofobicidade} - \text{polaridade}$$

onde: *hidrofobicidade* se refere as interações não polares (tais como as forças de dispersão e interações hidrofóbicas) do soluto com a fase orgânica e aquosa, a *polaridade* se refere as interações polares (tais como íon-dipolo, ponte de hidrogênio, forças de indução, etc.). Diversos métodos para calcular o Log P foram desenvolvidos a partir da estrutura química dos compostos, estes

são baseados nas constantes de substituição, constantes fragmentais, descritores eletrônicos, descritores estéricos, índices de conectividade, área de superfície e descritores de volume. Para este trabalho, o Log P foi calculado a partir do método de *Broto–Moreau–Vanduycke* (Todeschini e Consonni, 2009).

O método de *Broto–Moreau–Vanduycke* é baseado nas contribuições das constantes hidrofóbicas atômicas (a_k) medindo as contribuições lipofílicas dos átomos, cada um descrito por sua natureza, vizinhança atômica e conectividades associadas, assim considerando implicitamente alguns efeitos de proximidade e interações em sistemas conjugados. Átomos de hidrogênio e fatores de correção não são explicitamente considerados, o modelo é definido

$$\log P = b_0 + \sum_i a_i \cdot N_i \quad (2)$$

Onde:

N_i : número de ocorrências do tipo atômico i ;

a_i : constante do tipo atômico i .

pela equação 2:

Os tipos atômicos são classificados de acordo com seu ambiente estrutural, os átomos de carbono são diferenciados pelas suas ligações com outros átomos (exceto hidrogênio); heteroátomos são diferenciados pelas ligações com outros átomos (exceto hidrogênio) e seus vizinhos, além disso, se o vizinho for outro carbono, seu ambiente de ligações também é considerado. A contribuição da conjugação é levada em conta no fator de correção para carbonos sp^2 em sistemas conjugados. Utilizando uma série de 1868 compostos, 222 constantes atômicas foram propostas e o modelo de melhor ajuste teve um erro padrão de aproximadamente 0,4 unidade de log (Todeschini e Consonni, 2009; Broto *et al.*, 1984).

2.7.2 Descritores estruturais de caráter eletrônico

O efeito eletrônico agregado pelos grupos substituintes foi muito estudado por Hammett, através de seu trabalho que demonstrou a ionização de ácidos benzóicos *meta* ou *para*-substituídos em água a 25°C, demonstrando,

pela primeira vez, a ocorrência de relação linear entre os logaritmos da constante de ionização do ácido benzóico substituído e o logaritmo da constante de ionização do ácido benzoico (Hammett, 1937).

Desde então, a constante sigma, σ , definida por Hammett começou a ser muito utilizada nos modelos de QSAR e, passou a ser conhecida como constante de grupo, uma vez que mede a influência eletrônica de um dado grupo substituinte, independentemente da reação ou da molécula a que ela está ligada (Tavares, 2004).

Vários outros descritores estruturais de caráter eletrônico podem ser definidos por meio da observação de variações em propriedades físico-químicas de compostos químicos sensíveis ao efeito eletrônico de grupos substituintes. Parâmetros espectroscópicos como frequência de absorção na região do infravermelho, ν , deslocamentos químicos de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , δ , além de constantes de ionização, K , e variação no momento dipolar, μ , são alguns dos parâmetros que podem refletir a influência eletrônica de grupos substituintes sobre as propriedades de um determinado composto químico. Estes descritores em geral possuem significado físico e são empregados na elucidação dos detalhes envolvendo os complexos mecanismos de interação inter e intramoleculares (Tavares, 2004; Arroio *et al.*, 2010).

2.7.3 Descritores estruturais de caráter estérico

A importância da estereosseletividade na ação de um fármaco é bem conhecida. Há muitos exemplos que mostram a atividade dependente da sua configuração e geometria. Um dos exemplos é a diferença estabelecida entre isômeros ópticos, devido às suas capacidades de interagir seletivamente com um sistema biológico (Gaudio e Zandonade, 2001).

As moléculas, assim como seus receptores possuem estruturas tridimensionais complexas e únicas entre si, e não menos importantes, senão quanto muitas vezes decisivas para um estudo de QSAR, os descritores de caráter estérico se fundamentam na compreensão destas estruturas e a quantificação dos espaços intra e intermoleculares ocupados nos diversos momentos de variações de energia, sendo estas interações que desencadeiam

os efeitos farmacológicos das moléculas nos sítios de ligação (Gaudio e Zandonade, 2001; Tavares, 2004).

O estudo de QSAR clássico ou QSAR-2D, foi utilizado como uma metodologia bastante eficaz no estudo da relação entre a estrutura e a atividade das moléculas, no entanto, não considera o aspecto tridimensional das mesmas, assim sendo não expressa adequadamente os aspectos estereoquímicos relacionados. Graças ao advento da computação, as estruturas tridimensionais das moléculas puderam ser avaliadas qualitativamente e quantitativamente, e assim foram compreendidas para estudos de QSAR mais modernos. Um exemplo é o volume de Van der Waals (Vw), que está relacionado com o relevo de uma determinada estrutura ou sub-estrutura molecular, este parâmetro pode ser definido como sendo o volume impenetrável por outra molécula, obedecendo a lei da ação das massas (Tavares, 2004; Arroio *et al.*, 2010).

No entanto, para estruturas moleculares complexas que se dobram, parte da superfície de Vw é enterrada no interior e fica inacessível de interação com o solvente, que determina o comportamento químico das moléculas em solução. Uma esfera de raio de 1,5 Å é escolhida para entrar em contato com a molécula em questão, se houver várias cavidades na superfície de Vw onde a esfera não consiga entrar, então a superfície acessível ao solvente será significativamente diferente da superfície de Vw. Diversos algoritmos foram desenvolvidos para definir a área de superfície acessível ao solvente, o mais popular foi o desenvolvido por Connolly, sendo esta superfície conhecida como Área Molecular de Connolly (AMC). É um método de análise baseado na decomposição da superfície em um conjunto de regiões curvas, esféricas e elípticas que são expressas em termos de coordenadas atômicas, raio de Vw e distância radial (Todeschini e Consonni, 2009).

2.7.4 Outros descritores de propriedades físico-químicas

Estes descritores constituem a classe mais importante de medidas experimentais, e possuem papel fundamental como descritores moleculares,

tanto pela sua disponibilidade quanto pela sua interpretação na relação com a atividade biológica. As propriedades físico-químicas e suas combinações são constitutivas da maioria dos descritores. Algumas propriedades físico-químicas utilizadas como descritores em estudo de QSAR são, por exemplo: ponto de ebulição, ponto de fusão, densidade (ρ), constante dielétrica (ϵ), entalpia (H), constantes de equilíbrio (K), peso molecular, paracoro, pH, solubilidade, tensão superficial (γ), dentre outros (Todeschini e Consonni, 2009).

Os descritores físico-químicos mais relevantes no estudo de QSAR deste trabalho estão detalhados a seguir:

- Refratividade molar (MR)

A refatividade molar é o volume da substância ocupado por um mol desta substância. Na unidade do sistema internacional (SI), MR é representada em m³/mol. Sendo uma propriedade constitutivo-aditiva, é portanto altamente dependente da estrutura de um composto. Caracteriza-se como descritor molecular de um líquido, que contém ambas informações de volume molecular e polarizibilidade, é comumente definido pela equação de Lorenz-Lorentz (equação 3):

$$MR = \frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \times \frac{MW}{\rho} = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} \cdot \bar{V} \quad (3)$$

Onde:

MW: peso molecular;

ρ : densidade do líquido;

n_D^2 : índice de refração do líquido tendo referência a linha D do sódio;

ϵ : constante dielétrica;

\bar{V} : volume molar.

A MR pode ser utilizada para conceber uma série de moléculas bioativas, uma vez que a covariância da MR e hidrofobicidade é diminuída. Este parâmetro também pode servir como a medida da força de ligação entre porções polares de uma enzima e seu substrato (Tavares, 2004; Kubinyi *et al.*, 1993; Todeschini e Consonni, 2009).

- Constantes críticas

A pressão crítica (P_c), o volume crítico (V_c), e a temperatura crítica (T_c) são os valores de pressão P , volume (V_m) e temperatura termodinâmica (T) em que as densidades de coexistência de líquido e gás se tornam idênticas. A temperatura crítica (T_c) de uma substância é a temperatura que acima desta não existe distinção entre a fase gasosa e a líquida, ou seja, é a temperatura que um gás não pode ser liquefeito através do aumento de pressão. Quando se atinge a temperatura crítica, as propriedades de gás e líquido são as mesmas dando origem a uma nova fase: o fluido supercrítico. A pressão crítica P_c é a pressão de vapor na temperatura e volume crítico. O V_c é o volume de uma massa fixa de um fluido à temperatura e pressão crítica (Todeschini e Consonni, 2009).

- Pressão de vapor (V_p)

A pressão de vapor de um líquido é a pressão exercida pelo seu vapor quando o líquido e o vapor estão em equilíbrio dinâmico. A pressão de vapor é uma indicação de velocidade de evaporação de um líquido, relacionando-se com a tendência de moléculas e átomos de escapar de um líquido ou de um sólido. Uma substância com uma pressão de vapor elevada em temperatura ambiente é muitas vezes referida como volátil. Quanto maior for a pressão de vapor de um material em uma determinada temperatura, menor o ponto de ebulição (Todeschini e Consonni, 2009).

2.8 QSAR NA PESQUISA DE AGENTES DE CONTROLE DE INSETOS

Modelagem por QSAR é uma poderosa ferramenta para racionalizar as diferenças de atividade biológica entre compostos levando em conta sua variação estrutural. Um QSAR de alta qualidade pode ser utilizado para prever as atividades de moléculas antes mesmo de serem testadas ou sintetizadas, desde que a estrutura pertença a mesma classe para qual o QSAR foi desenvolvido (Basak *et al.*, 2005). Este modelo emprega descritores extra-termodinamicamente gerados por computador relacionando com sistemas celulares, receptores isolados e *in vivo*. Esta relação quantitativa é representada por meio de uma equação matemática e que possui relevância

estatística, a equação obtida não apenas deve possuir bom poder de predição mas também deve demonstrar ser robusta e não obtida ao acaso (Hansch e Verma, 2009; Martins e Ferreira, 2013).

Em equações de QSAR, n é o número de moléculas utilizadas, r é o coeficiente de correlação entre os valores observados da variável dependente (atividade) e os valores calculados pela equação, r^2 é o quadrado do coeficiente de correlação, também chamado de coeficiente de determinação e indica a qualidade de ajuste, q^2 é a validação cruzada (a medida da qualidade do modelo), e s é o desvio padrão. O q^2 é obtido através do uso do procedimento *leave-one-out* (LOO). Q é o fator de qualidade, $Q = r/s$, onde r é o coeficiente de correlação e s o desvio padrão. Ao usar um elevado número de parâmetros na equação, poderá ocorrer o “*overfitting*”, que significa uma falsa alta predição do modelo através do aumento artificial de r e s , que pode ser detectado através da análise de Q . Altos valores de Q indicam alta previsibilidade do modelo e ausência de *overfitting* (Hansch e Verma, 2009). “ F ” ou valor estatístico de Fischer (equação 4) que é a relação entre a variância explicada e a não explicada determinada pelo número de graus de liberdade (equação 5):

$$F = \frac{fr^2}{[(1 - r^2)m]} \quad (4)$$

$$f = [n - (m + 1)] \quad (5)$$

Onde:

f = número de graus de liberdade

n = número amostral (moléculas)

m = número de variáveis (descritores)

r^2 = coeficiente de determinação

O valor de F é na verdade, a razão entre a variância explicada e não explicada para um determinado número de graus de liberdade, assim este indica a verdadeira correlação e o nível de significância das regressões lineares múltiplas. Um modelo se diz otimizado, quando Q atinge seu máximo valor juntamente com F (Hansch e Verma, 2009).

Um típico problema nas equações de QSAR são a presença de compostos *outliers*. Estes compostos são aqueles que tem atividade biológica inesperada e são incapazes de ajustar-se em um modelo de QSAR. São valiosas informações que definem as limitações do modelo sob quais compostos agem por um mesmo mecanismo molecular regido pela influência de um ou mais descritores. Assim, os *outliers* devem receber atenção especial afim de descobrir qual, ou quais motivos para esta diferença de atividade ser determinada. Modelos de QSAR com poucos ou nenhum composto *outlier* são bons modelos, por outro lado, aqueles modelos com alto número de outliers são modelos ruins. A análise dos *outliers* determina se o conjunto de compostos utilizados no modelo possuem o mesmo, ou diferentes mecanismos de ação (Verma e Hansch, 2005).

A análise de regressão linear múltipla é um dos modelos mais utilizados para estabelecer correlações entre um conjunto de parâmetros físico-químicos (variáveis independentes) e com sua atividade biológica (variável dependente) (Gaudio e Zandonade, 2001). O estudo de QSAR neste trabalho teve o intuito de avaliar quais os descritores, ou parâmetros físico-químicos, que tem correlação no aumento ou diminuição do valor de CL_{50} que indicam os valores que matam 50% da população de larvas do *Ae. aegypti* tendo intervalo de confiança de 95% (IC_{95}).

Diversos trabalhos publicados na literatura utilizaram o QSAR como ferramenta de avaliação de novos agentes contra o *Ae. aegypti*, uma revisão feita por Devillers (2014) apresentou os modelos encontrados na literatura. A revisão demonstrou que os modelos de QSAR publicados possuem significância estatística e robustez. O objetivo do trabalho realizado foi de contabilizar as diferentes estratégias utilizadas para encontrar novos compostos ativos contra o *Ae. aegypti*. Esta diversidade engloba as estruturas

químicas utilizadas, o mecanismo de ação ou suposto mecanismo, os descritores moleculares, os métodos estatísticos, etc.

Marles (1991), avaliou a toxicidade de 41 tiofenos naturais e sintéticos frente as larvas do mosquito *Ae. atropalpus*, destes, 17 compostos apresentaram extrema fototoxicidade em escala nanomolar. Foi demonstrado que 84% da variação na fototoxicidade destes compostos pôde ser explicada através do log P juntamente com a taxa de produção de oxigênio singlete. Os derivados com substituintes pequenos apresentaram maior CL₅₀, enquanto os derivados com cadeia lateral alifática provocaram uma diminuição da potência.

No trabalho de Grodnitzky e Coats, (2002), foi avaliada a atividade inseticida de 30 monoterpenos naturais e derivados sintéticos frente a *Musca domestica*. Os derivados ésteres de monoterpenos foram sintetizados com anidrido ou cloreto de ácido em CHCl₃, catalisada com adição de piridina. Derivados éteres de timol foram sintetizados com haleto de alquila na presença de brometo de benziltributilamônio. O desenvolvimento do QSAR do estudo foi dividido em duas séries, os derivados monoterpênicos e derivados do timol. Nos dois modelos de QSAR foi demonstrada forte correlação de parâmetros eletrônicos com a atividade inseticida ($r = 0,84$ e $r = 0,90$ respectivamente).

O estudo da síntese, QSAR de derivados triorganoestânicos publicado por Song e colaboradores (2007), avaliou a toxicidade dos derivados frente larvas do *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* em segundo estágio. Os complexos foram sintetizados a partir do ácido 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxílico juntamente com o composto organoestânico correspondente em refluxo utilizando tolueno a quente como solvente. Os derivados apresentaram toxicidade para as três espécies de larva. Apesar da toxicidade entre as três espécies ser estatisticamente igual, os modelos de QSAR propostos para cada espécie obtiveram diferentes descritores, levando o autor a conclusão que os derivados organoestânicos poderiam ter diferentes mecanismos de causar a morte das larvas. O modelo com maior índice de determinação foi o obtido para o *Culex quinquefasciatus* ($r^2 = 0,92$) onde o descritor utilizado foi a área de superfície da molécula.

Baseado nos interessantes resultados obtidos por Song e colaboradores (2007), Hansch e Verma (2009) propuseram novos modelos de QSAR avaliando outros descritores como o π de Hansch e a MR, sugerindo que derivados com grupamentos altamente lipofílicos serão mais ativos, no entanto, devido ao número limitado de compostos utilizados ($n=6$), as equações geradas devem ser utilizadas com cautela. Outros trabalhos tiveram seus QSAR reavaliados e a conclusão foi que o parâmetro lipofílico π de Hansch e o parâmetro eletrônico σ de Hammett foram os dois maiores determinantes na atividade larvícida dos derivados organoestânicos. Sete das nove equações demonstraram correlação da lipofilia com a atividade. Uma equação apresentou modelo parabólico, que reflete uma situação onde a adição de grupos lipofílicos aumenta a atividade até um ponto ótimo, e então diminui. Segundo Hansch e Verma (2009), este é um exemplo encorajador, já que a obtenção de um valor de π ótimo e bem definido ($\pi = 0,36$), o que prova ser um modelo adequado para limitar a síntese de compostos derivados com alta possibilidade de atividade larvícida contra o *Ae. aegypti*.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Obter uma equação matemática resultante da relação quantitativa entre as propriedades físico-químicas do (-)-borneol e a atividade larvícida frente as larvas de *Ae. aegypti*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar doze derivados do (-)-borneol;
- Testar a atividade larvícida dos compostos sintetizados frente as larvas de *Ae. aegypti*;
- Avaliar a influência qualitativa do tamanho do radical na potencialização da CL₅₀ dos derivados;
- Realizar um estudo de QSAR baseado em 12 (doze) compostos derivados do (-)-borneol a modo de obter uma equação que indique as propriedades relevantes para o aumento da atividade larvícida, apontando um caminho no desenvolvimento de novos candidatos larvícidas.

4. EXPERIMENTAL

A etapa química e a etapa biológica desta dissertação foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.1. ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1. Aparelhos utilizados:

- Aparelho de Infravermelho (PERKIN ELMER FT-IR, System Spectrum BX);
- Aparelho de RMN da marca Bruker AVANCE III 600;
- Balança analítica de precisão de marca MARCONI, AW 220;
- Balança analítica semi-micro de alta precisão marca SHIMADZU AUW 220D;
- Espectrômetro de massa da marca Bruker Daltonics, MICROTOF II – ESI-TOF;
- Evaporador rotativo da marca FISATOM;
- Evaporador rotativo da marca LOGEN;
- Placa aquecedora com agitação magnética da marca FISATOM;
- Placa de CCDA da marca MACHEREY-NAGEL;
- Soprador de ar quente da marca TOYO TA-1050B

4.1.2 Substâncias, reagentes e outros materiais utilizados:

- (-)-borneol (Sigma Aldrich)
- Acetato de Etila (Fmaia)
- Anidrido acético (Ac_2O) (Impex)
- Cloreto de butirila ($\text{C}_4\text{H}_7\text{OCl}$) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de cloroacetila ($\text{C}_2\text{H}_2\text{OCl}_2$) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de heptanoila ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{OCl}$) (Sigma Aldrich)

- Cloreto de hexanoila ($C_6H_{11}OCl$) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de isobutirila (C_4H_7OCl) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de isovaleroila (C_5H_9OCl) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de propionila (C_2H_5OCl) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de tricloroacetila (C_2OCl_4) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de trimetilacetila (C_5H_9OCl) (Sigma Aldrich)
- Cloreto de valeroila (C_5H_9OCl) (Sigma Aldrich)
- Diclorometano (CH_2Cl_2) (Quimex)
- Dimetilaminopiridina (DMAP) (Sigma Aldrich)
- Dimetilsufóxido (DMSO) (Synth)
- Éter etílico (Fmaia)
- Hexano (Dinâmica)
- Pipetas automáticas (ecopipette TM)
- Piridina (Synth)
- Seringas graduadas de 1mL; 5mL; 10mL e 20mL
- Sílica gel 60, ART 7734 0,063-0,200 mm (Sigma Aldrich)
- Sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) (Vetec)
- Temephos (Sigma Aldrich)
- Tween 80 (Vetec)

4.1.3. Métodos Cromatográficos

A técnica de cromatografia em coluna (CC) foi realizada empregando como fase estacionária sílica gel 60, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm sendo acomodadas dentro de colunas de vidro cilíndricas de dimensões variadas de acordo com a quantidade de composto a ser purificado. Na fase móvel foram utilizados os solventes hexano e acetato de etila em misturas binárias, com gradientes crescentes de polaridade, (36:1); (18:1) e (9:1).

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas utilizando cromatofolhas de sílica gel, eluídas em solução Hexano/Acetato de Etila (9:1).

A revelação dos compostos foi efetuada pela exposição das placas a solução de anisaldeído, seguida de aquecimento da cromatofolha a altas temperaturas por alguns segundos.

4.1.4. Métodos Espectrométricos

Os compostos foram identificados por espectroscopia de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C), espectrometria de massas. Os espectros de Infravermelho foram obtidos no equipamento PERKIN ELMER FT-IR BX, do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro da marca Bruker AVANCE III 600, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, operando a 600 MHz (^1H) e 150 MHz (^{13}C).

Adicionalmente foram realizadas técnicas bidimensionais de RMN. Estas técnicas permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$, $^nJ_{\text{C,H}}$, $^nJ_{\text{C,C}}$) ou espacial (H,H- ou H,C) entre si. Por consequência, foi possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas 1D e comparação com dados de possíveis compostos na literatura. Três técnicas 2D foram realizadas na identificação dos compostos neste trabalho: *Homonuclear Correlation Spectroscopy* (COSY), através dela foi possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^{2-3}J_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais, mensuráveis no espectro 1D) e assim diferenciar os múltiplos sinais observados no espectro de RMN ^1H . As outras duas técnicas foram realizadas com detecção inversa: o *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (HMBC), e o *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC). Pelo HMBC pode-se assinalar todos os carbonos que contem hidrogênios, após todos os hidrogênios no espectro de RMN ^1H terem sido assinalados, as correlações referem-se a acoplamentos $^nJ_{\text{C-H}}$ ($n \geq 2$), o espectro de HMBC é editado com o eixo horizontal correspondendo aos δH e o eixo vertical correspondendo aos δC . A detecção inversa é realizada por intermédio de um núcleo muito mais sensível, indiretamente pelo canal de ^1H , do que através do canal direto de ^{13}C ,

a vantagem é a alta sensibilidade e o menor tempo de análise das amostras. O HSQC possui o aspecto de um HMBC, porém envolvendo transições quânticas simples, sendo editado com os cruzamentos devidos a grupos CH_2 em fase oposta a grupos CH e CH_3 e mostrando também as correlações C-H-H (Kaiser, 2000).

A amostras foram preparadas para análise dissolvendo-se uma pequena quantidade em solvente deuterado, CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), este utilizado como padrão interno em todos os experimentos.

Os espectros de massas foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto – USP, no equipamento micrOTOF II - ESI-TOF, bomba de infusão com fluxo $300\mu\text{l/h}$. O Aparelho é de Alta Resolução necessitando de calibração interna antes de realizar as análises. O método empregado para se obter os espectros de Massas será aquele que utiliza a ionização por electrospray (spray eletrostático, ESI/EM).

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

Os derivados **(2-13)** foram sintetizados de acordo com as metodologias descritas por Matos e Andrade (2008), e Devlin e colaboradores (2005), com modificações, que visaram aumentar sua eficiência. O (-)-borneol **(1)** foi utilizado como material de partida para todas as reações. Os derivados ésteres da hidroxila alifática foram sintetizados através da reação em meio levemente básico com cloreto de ácido respectivo em meio anidro. Para obter-se um maior rendimento nas reações utilizou-se 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador.

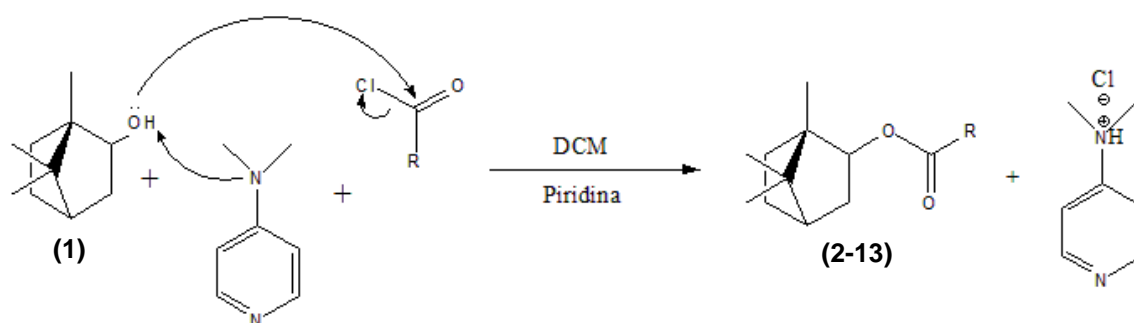


Figura 9: Mecanismo simplificado da reação de esterificação do borneol.

Procedimento geral para a síntese dos compostos:

Um balão de fundo redondo de 25 mL foi flambado em bico de Bunsen, após adicionado o agitador magnético onde vedou-se com rolha de látex, injetou-se em seguida N₂ e acoplado uma bexiga também com N₂ para que a reação ocorra sem a presença de ar atmosférico contendo umidade. Após o resfriamento do balão a rolha de borracha foi retirada cuidadosamente para não deslocar os gases dentro do balão, adicionou-se em seguida os reagentes sólidos: 1,5 g de (-)-borneol (9,73 mmol) e 70 mg de DMAP, jatos de N₂ para expulsar qualquer ar atmosférico que possa ter entrado no balão durante o procedimento, imediatamente veda-se o balão.

Com o auxílio de uma seringa graduada adiciona-se 3,75 mL de piridina anidra recém-destilada e 1,25 mL de diclorometano (DCM) também recém-destilado completando os 5 mL do sistema de solvente na reação Piridina/DCM (3:1), a mistura foi submetida a agitação magnética por 10 minutos para a

completa dissolução dos componentes sólidos da reação. Em banho de gelo a 0°C adicionou-se cuidadosamente à reação: 10,7 mmol do cloreto de ácido correspondente (adicionou-se 10% a mais para otimizar a síntese). Deixou-se reagindo em temperatura ambiente sob agitação magnética por 24 h.

A reação foi acompanhada por CCDA, quando não se observa a banda do produto de partida ((-)-borneol) pode-se considerar que a reação está completa. Após verificar o termino da reação a mesma é interrompida através da adição de 25 mL de água destilada. O conteúdo do balão é vertido em um funil de separação e o composto extraído com 3 porções de 20 mL de éter etílico. A fase orgânica é coletada e seca com MgSO_4 e filtrada em papel filtro. O líquido filtrado foi levado ao evaporador rotativo Logen® sob vácuo a 40°C e após rotaevaporado novamente a 80°C no rotaevaporador Fisatom® o qual possui um sistema de vácuo de bomba elétrica que permite retirar os resquícios de piridina que não são possíveis retirar no equipamento anterior. O término da rotaevaporação se dá pela ausência do odor característico da piridina nos compostos, após extrair o máximo de resíduos, purifica-se os compostos por cromatografia em coluna utilizando Sílica gel 60 em sistema gradiente de hexano/acetato de etila (36:1) com progressão de polaridade para (18:1) e (9:1) de modo a obter o produto purificado.

Os compostos obtidos (figura 10), foram levados ao aparelho de concentrador sob vácuo parcial (-0,5 bar) com observação continua para retirada de todo resquício de solvente do composto. Os frascos foram previamente tarados e pesados para cálculo do rendimento, uma alíquota foi separada para análise em espectroscopia de Infravermelho, massas e RMN ^1H e ^{13}C .

Os derivados foram sintetizados e purificados conforme descrito acima. Os dados de rendimento, características físicas, espectrometria de massas (EM), espectroscopia de infravermelho (IR) e espectrometria de ^1H (^1H NMR) e ^{13}C (^{13}C NMR) dos doze derivados seguem respectivamente:

4.2.1 Acetato de bornila (**2**)

Rendimento: 79,9%, óleo incolor, EM (ESI) m/z : 219,1339 $[M+Na]^+$. IR $\nu_{\max}(\text{NaCl}) \text{ cm}^{-1}$ 2955 – 1742 – 1175 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.88 (*ddd*, 1H, J = 9.9, 3.6 e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.34 (*dddd*, 1H, J = 13.6, 9.9, 4.7 e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.05 (*s*, 3H, H-12), 1.94 (*ddd*, 1H, J = 12.8, 9.4 e 4.7 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, J = 12.2, 12.0, 4.7, 4.5 e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.66 (*dd*, 1H, J = 4.7 e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.29 (*dddd*, 1H, J = 12.8, 12.0, 4.5 e 2.2 Hz, 6_{eq}), 1.23 (*ddd*, 1H, J = 12.2, 9.4 e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 0.97 (*dd*, 1H, J = 13.6 e 3.6 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.83 (*s*, 3H, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.4 (C-11), 79.8 (C-2), 48.7 (C-7), 47.8 (C-1), 44.9 (C-4), 36.9 (C-3), 28.0 (C-5), 27.1 (C-6), 21.2 (C-12), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9) e 13.5 (C-10).

4.2.2 Propanoato de bornila (**3**)

Rendimento: 76,6%; óleo incolor; EM (ESI) m/z : 233,1512 $[M+Na]^+$; IR $\nu_{\max}(\text{NaCl}) \text{ cm}^{-1}$ 2954 – 1740 – 1187 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.88 (*ddd*, 1H, J = 9.9, 3.6 e 2.3 Hz, H-2_{eq}), 2.34 (*dddd*, 1H, J = 13.7, 9.9, 4.7 e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.33 (*q*, 2H, J = 7.6 Hz, H-12), 1.94 (*ddd*, 1H, J = 12.9, 9.5 e 4.7 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, J = 12.3, 11.9, 4.7, 4.5 e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.66 (*dd*, 1H, J = 4.7 e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.29 (*dddd*, 1H, J = 12.9, 11.9, 4.5 e 2.3 Hz, 6_{eq}), 1.23 (*ddd*, 1H, J = 12.3, 9.5 e 4.7 Hz, H-5_{ax}), 1.15 (*t*, 3H, J = 7.6 Hz, H-13), 0.95 (*dd*, 1H, J = 13.7 e 3.6 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.83 (*s*, 3H, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 174.8 (C-11), 79.6 (C-2), 48.7 (C-7), 47.8 (C-1), 44.9 (C-4), 36.8 (C-3), 28.0 (C-5), 27.9 (C-12), 27.0 (C-6), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9), 13.5 (C-10) e 9.30 (C-13).

4.2.3 Butanoato de bornila (**4**)

Rendimento: 70,3%; óleo incolor; EM (ESI) m/z : 247,1671 $[M+Na]^+$; IR $\nu_{\max}(\text{NaCl}) \text{ cm}^{-1}$ 2956 – 1736 – 1184 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.89 (*ddd*, 1H, J = 9.9, 3.5 e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.34 (*dddd*, 1H, J = 13.5, 9.9, 4.7 e 3.4 Hz, H-3_{eq}), 2.30 (*t*, 2H, J = 7.4 Hz, H-12), 1.94 (*ddd*, 1H, J = 12.8, 9.5 e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, J = 13.8, 12.0, 4.6, 4.4 e 3.4 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*tq*, 2H, J = 7.4 e 7.4 Hz, H-13), 1.66 (*dd*, 1H, J = 4.7 e 4.4 Hz, H-4_{eq}), 1.29 (*dddd*, 1H, J = 12.8,

12.0, 4.4 e 2.2 Hz, 6_{eq}), 1.22 (*ddd*, 1H, $J = 12.1$, 9.5 e 4.4 Hz, H-5_{ax}), 0.96 (*t*, 3H, H-14), 0.95 (*dd*, 1H, $J = 13.5$ e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.82 (*s*, 3H, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 174.0 (C-11), 79.5 (C-2), 48.7 (C-7), 47.7 (C-1), 44.9 (C-4), 36.8 (C-3), 36.6 (C-12), 28.0 (C-5), 27.1 (C-6), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9), 18.6 (C-13), 13.7 (C-14) e 13.5 (C-10).

4.2.4 Pentanoato de bornila (5)

Rendimento 67,5%; óleo incolor; EM (ESI) m/z : 261,1828 [M+Na]⁺. IR ν_{\max} (NaCl) cm⁻¹ 2956 – 1736 – 1180 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.89 (*ddd*, 1H, $J = 9.9$, 3.6 e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.35 (*dddd*, 1H, $J = 13.5$, 9.9, 4.6 e 3.4 Hz, H-3_{eq}), 2.31 (*t*, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-12), 1.94 (*ddd*, 1H, $J = 12.8$, 9.5 e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, $J = 14.0$, 12.0, 4.6, 4.5 e 3.4 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*dd*, 1H, $J = 4.6$ e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.62 (*tt*, 2H, $J = 7.5$ e 7.4 Hz, H-13), 1.36 (*tq*, 2H, 7.4 e 7.4 Hz, H-14), 1.29 (*dddd*, 1H, $J = 12.8$, 12.0, 4.5 e 2.2 Hz, 6_{eq}), 1.22 (*ddd*, 1H, $J = 12.2$, 9.5 e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 0.95 (*dd*, 1H, $J = 13.5$ e 3.6 Hz, H-3_{ax}), 0.92 (*t*, 3H, $J = 7.4$ Hz H-15), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.82 (*s*, 3H, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 174.1 (C-11), 79.5 (C-2), 48.7 (C-7), 47.8 (C-1), 44.9 (C-4), 36.8 (C-3), 34.5 (C-12), 28.1 (C-5), 27.2 (C-13), 27.1 (C-6), 22.2 (C-14), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9), 13.7 (C-15) e 13.5 (C-10).

4.2.5 Hexanoato de bornila (6)

Rendimento: 69,2%; óleo levemente amarelo; EM (ESI) m/z : 275,1981 [M+Na]⁺. IR ν_{\max} (NaCl) cm⁻¹ 2960 – 1736 – 1176 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.88 (*ddd*, 1H, $J = 9.9$, 3.5 e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.34 (*dddd*, 1H, $J = 13.7$, 9.9, 4.7 e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.31 (*t*, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-12), 1.94 (*ddd*, 1H, $J = 13.0$, 9.5 e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, $J = 12.3$, 12.0, 4.6, 4.3 e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*dd*, 1H, $J = 4.7$ e 4.3 Hz, H-4_{eq}), 1.63 (*tt*, 2H, $J = 7.5$ e 7.4 Hz, H-13), 1.33 (*m*, 2H, H-15), 1.32 (*m*, 2H, H-14), 1.30 (*dddd*, 1H, $J = 13.0$, 12.0, 4.5, 2.2 Hz, 6_{eq}), 1.22 (*ddd*, 1H, $J = 12.3$, 9.5 e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 0.95 (*dd*, 1H, $J = 13.7$ e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*t*, 3H, $J = 6.9$ Hz H-16), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.82 (*s*, 3H, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 174.2 (C-11), 79.6 (C-2), 48.7 (C-7), 47.8

(C-1), 44.9 (C-4), 36.9 (C-3), 34.7(C-12), 31.4 (C-14), 28.0 (C-5), 27.1 (C-6), 24.8 (C-13), 22.3 (C-15), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9), 13.9 (C-16) e 13.5 (C-10).

4.2.6 Heptanoato de bornila (**7**)

Rendimento: 71,4%; óleo amarelo dourado; EM (ESI) m/z : 289,2138 $[M+Na]^+$. IR $\nu_{max}(NaCl)$ cm^{-1} 2956 – 1736 – 1160 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 4.89 (*ddd*, 1H, $J = 9.9, 3.5$ e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.34 (*dddd*, 1H, $J = 13.7, 9.9, 4.8$ e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.31 (*t*, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-12), 1.94 (*ddd*, 1H, $J = 12.9, 9.5$ e 4.5 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, $J = 12.2, 12.0, 4.6, 4.5$ e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*dd*, 1H, $J = 4.8$ e 4.6 Hz, H-4_{eq}), 1.62 (*tt*, 2H, $J = 7.6$ e 7.5 Hz, H-13), 1.32 (*m*, 2H, H-14), 1.31 (*m*, 2H, H-15), 1.30 (*m*, 2H, H-16), 1.29 (*dddd*, 1H, $J = 12.9, 12.0, 4.5$ e 2.2 Hz, 6_{eq}), 1.22 (*ddd*, 1H, $J = 12.2, 9.5$ e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 0.95 (*dd*, 1H, $J = 13.7$ e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.88 (*t*, 3H, $J = 6.8$ Hz H-17), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.82 (*s*, 3H, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 174.1 (C-11), 79.6 (C-2), 48.7 (C-7), 47.8 (C-1), 44.9 (C-4), 36.9 (C-3), 34.7(C-12), 31.5 (C-15), 28.8 (C-14), 28.0 (C-5), 27.1 (C-6), 25.1 (C-13), 22.5 (C-16), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9), 14.1 (C-17) e 13.5 (C-10).

4.2.7 Benzoato de bornila (**8**)

Rendimento: 74,6%; óleo incolor; EM (ESI) m/z : 281,1509 $[M+Na]^+$. IR $\nu_{max}(NaCl)$ cm^{-1} 2954 – 1718 – 1274 - 1116 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.06 (*dd*, 2H, $J = 8.4$ e 1.4 Hz, H-13 e H-13'), 7.55 (*tt*, 1H, $J = 7.4$ e 1.4 Hz, H-15), 7.44 (*tt*, 1H, $J = 8.4$ e 7.4 Hz, H-14 e H-14'), 5.12 (*ddd*, 1H, $J = 9.9, 3.5$ e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.47 (*dddd*, 1H, $J = 13.9, 9.9, 4.7$ e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.14 (*ddd*, 1H, $J = 12.9, 9.5$ e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.81 (*dddd*, 1H, $J = 12.3, 12.0, 4.6, 4.4$ e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.73 (*dd*, 1H, $J = 4.7$ e 4.4 Hz, H-4_{eq}), 1.41 (*dddd*, 1H, $J = 12.9, 12.0, 4.5$ e 2.2 Hz, 6_{eq}), 1.31 (*ddd*, 1H, $J = 12.3, 9.5$ e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 1.12 (*dd*, 1H, $J = 13.9$ e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.97 (*s*, 3H, H-9), 0.91 (*s*, 3H, H-8) e 0.91 (*s*, 3H, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 166.8 (C-11), 132.7 (C-15), 130.9 (C-12), 129.5 (C-13 e C-13'), 128.3 (C-14 e C-14'), 80.5 (C-2), 49.1 (C-7), 47.9 (C-1), 45.0 (C-4), 36.9 (C-3), 28.1 (C-5), 27.4 (C-6), 19.7 (C-8), 18.9 (C-9) e 13.6 (C-10).

4.2.8 Isobutirato de bornila (**9**)

Rendimento: 73,8%; óleo incolor; EM (ESI) m/z : 247,1668 $[M+Na]^+$. IR $\nu_{\max}(\text{NaCl}) \text{ cm}^{-1}$ 2956 – 1734 – 1156 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.88(*ddd*, 1H, J = 9.9, 3.5 e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.55 (sept, 1H, J = 7.0 e 6.9 Hz, H-12), 2.34 (*dddd*, 1H, J = 13.7, 9.9, 4.7 e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 1.96 (*ddd*, 1H, J = 12.7, 9.5 e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, J = 12.2, 12.0, 4.6, 4.5 e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*dd*, 1H, J = 4.7 e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.30 (*dddd*, 1H, J = 12.7, 12.0, 4.5 e 2.2 Hz, H-6_{eq}), 1.23 (*ddd*, 1H, J = 12.2, 9.5 e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 1.18 (*d*, 1H, J = 7.0 Hz, H-14), 1.17 (*d*, 1H, J = 6.9 Hz, H-13), 0.93 (*dd*, 1H, J = 13.7 e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.82 (*s*, 3H, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 174.3 (C-11), 79.4 (C-2), 48.8 (C-7), 47.8 (C-1), 44.9 (C-4), 36.8 (C-3), 34.3 (C-12), 28.0 (C-5), 27.1 (C-6), 19.7 (C-8), 19.1 (C-14), 18.9 (C-13), 18.8 (C-9) e 13.4 (C-10).

4.2.9 Pivaloato de bornila (**10**)

Rendimento: 71,2% óleo levemente amarelado EM (ESI) m/z : 261,1831 $[M+Na]^+$. IR $\nu_{\max}(\text{NaCl}) \text{ cm}^{-1}$ 2956 - 1728 - 1158 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.84(*ddd*, 1H, J = 9.9, 3.5 e 2.3 Hz, H-2_{eq}), 2.35 (*dddd*, 1H, J = 13.9, 9.9, 4.7 e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 1.97 (*ddd*, 1H, J = 12.7, 9.5 e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.75 (*dddd*, 1H, J = 12.2, 12.1, 4.6, 4.4 e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*dd*, 1H, J = 4.7 e 4.4 Hz, H-4_{eq}), 1.31 (*dddd*, 1H, J = 12.7, 12.1, 4.5 e 2.3 Hz, H-6_{eq}), 1.23 (*ddd*, 1H, J = 12.2, 9.5 e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 1.21 (*s*, 12H, H-13, H-14 e H-15), 0.90 (*dd*, 1H, J = 13.9 e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.91 (*s*, 3H, H-9), 0.88 (*s*, 3H, H-8) e 0.83 (*s*, 3H, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 178.7 (C-11), 79.4 (C-2), 48.8 (C-7), 47.8 (C-1), 44.9 (C-4), 38.9 (C-12), 36.9 (C-3), 28.0 (C-5), 27.2 (C-13, C-14 e C-15), 27.1 (C-6), 19.7 (C-8), 18.9 (C-13), 18.8 (C-9) e 13.5 (C-10).

4.2.10 Isovaleroato de bornila (**11**)

Rendimento: 66,9% óleo incolor EM (ESI) m/z : 261,1824 $[M+Na]^+$. IR $\nu_{\max}(\text{NaCl}) \text{ cm}^{-1}$ 2956 – 2874 – 1736 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.89(*ddd*, 1H, J = 9.9, 3.5 e 2.3 Hz, H-2_{eq}), 2.35 (*dddd*, 1H, J = 13.6, 9.9, 4.7 e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.19 (*t*, 2H, J = 7.3 Hz, H-12), 2.12 (*tsxt*, 1H, J = 7.3 e 6.7 Hz, H-13), 1.94 (*ddd*, 1H, J = 12.8, 9.5 e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.74 (*dddd*, 1H, J = 12.2, 12.0, 4.6, 4.5 e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.67 (*dd*, 1H, J = 4.7 e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.30 (*dddd*, 1H, J =

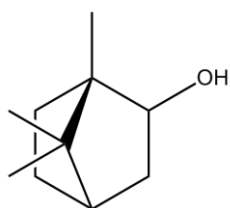
12.8, 12.0, 4.5 e 2.3 Hz, H-6_{eq}), 1.22 (*ddd*, 1H, $J = 12.2, 9.5$ e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 0.96 (*d*, 2H, $J = 6.7$ Hz, H-14 e H-15), 0.95 (*dd*, 1H, $J = 13.6$ e 3.5 Hz, H-3_{ax}), 0.90 (*s*, 3H, H-9), 0.87 (*s*, 3H, H-8) e 0.83 (*s*, 3H, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 173.4 (C-11), 79.6 (C-2), 48.7 (C-7), 47.7 (C-1), 44.9 (C-4), 43.9 (C-12), 36.9 (C-3), 28.0 (C-5), 25.8 (C-13), 22.4 (14 e 15), 27.1 (C-6), 19.7 (C-8), 18.8 (C-9) e 13.5 (C-10).

4.2.11 Cloroacetato de bornila (**12**)

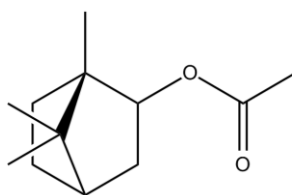
Rendimento: 29,4% óleo amarelo EM (ESI) m/z : 253,2128 [M+Na]⁺. IR ν_{\max} (NaCl) cm⁻¹ 2955 – 2880 – 1756 – 1734 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.97(*ddd*, 1H, $J = 9.9, 3.4$ e 2.3 Hz, H-2_{eq}), 4.06 (*s*, 3H, H-12), 2.39(*dddd*, 1H, $J = 13.8, 9.9, 4.7$ e 3.4 Hz, H-3_{eq}), 1.94 (*ddd*, 1H, $J = 12.9, 9.5$ e 4.6 Hz, H-6_{ax}), 1.76 (*dddd*, 1H, $J = 12.3, 12.0, 4.6, 4.5$ e 3.4 Hz, H-5_{eq}), 1.70 (*dd*, 1H, $J = 4.7$ e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.32 (*dddd*, 1H, $J = 12.9, 12.0, 4.5$ e 2.3 Hz, H-6_{eq}), 1.25 (*ddd*, 1H, $J = 12.3, 9.5$ e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 1.02 (*dd*, 1H, $J = 13.8$ e 3.4 Hz, H-3_{ax}), 0.91(*s*, 3H, H-9), 0.88 (*s*, 3H, H-8) e 0.85 (*s*, 3H, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 167.4 (C-11), 82.1 (C-2), 49.0 (C-7), 48.8 (C-1), 44.9 (C-4), 41.2 (C-12), 36.5 (C-3), 27.9 (C-5), 27.0 (C-6), 19.6 (C-8), 18.8 (C-9) e 13.4 (C-10).

4.2.12 Tricloroacetato de bornila (**13**)

Rendimento: 78,5% óleo incolor EM (ESI) m/z : 321,0158 [M+Na]⁺. IR ν_{\max} (NaCl) cm⁻¹ 2958 – 2884 – 1762 - 1250 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 5.04 (*ddd*, 1H, $J = 9.9, 3.4$ e 2.2 Hz, H-2_{eq}), 2.43(*dddd*, 1H, $J = 14.0, 9.9, 4.7$ e 3.3 Hz, H-3_{eq}), 2.02 (*ddd*, 1H, $J = 13.1, 9.5$ e 4.4 Hz, H-6_{ax}), 1.80 (*dddd*, 1H, $J = 12.2, 11.8, 4.5, 4.4$ e 3.3 Hz, H-5_{eq}), 1.76 (*dd*, 1H, $J = 4.7$ e 4.5 Hz, H-4_{eq}), 1.37 (*dddd*, 1H, $J = 13.1, 11.8, 4.5$ e 2.2 Hz, H-6_{eq}), 1.29 (*ddd*, 1H, $J = 12.2, 9.5$ e 4.5 Hz, H-5_{ax}), 1.14 (*dd*, 1H, $J = 14.0$ e 3.4 Hz, H-3_{ax}), 0.93(*s*, 3H, H-9), 0.91 (*s*, 3H, H-8) e 0.91 (*s*, 3H, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 162.1 (C-11), 90.7 (C-12), 85.9 (C-2), 49.4 (C-7), 48.1 (C-1), 44.8 (C-4), 36.0 (C-3), 27.8 (C-5), 26.9 (C-6), 19.6 (C-8), 18.9 (C-9) e 13.4 (C-10).



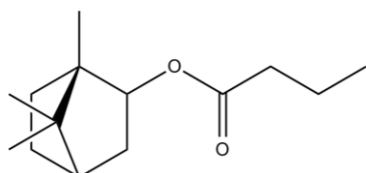
(-) - Borneol



Acetato de bornila

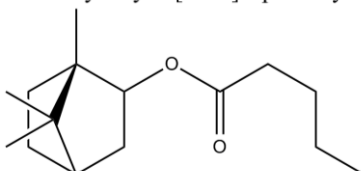
(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl acetate

(3)



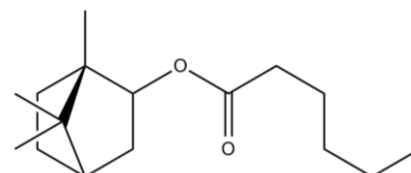
Butanoato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl butyrate



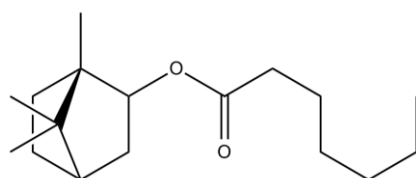
Pentanoato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl pentanoate



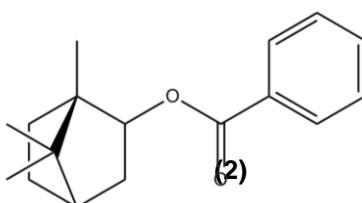
Hexanoato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl hexanoate



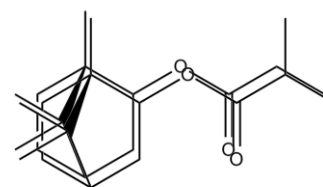
Heptanoato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl heptanoate



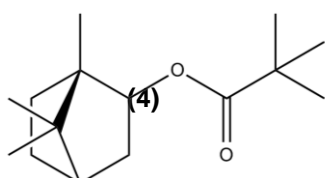
Benzoato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl benzoate



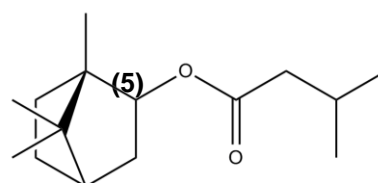
Isobutirato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl isobutyrate



Pivaloato de bornila

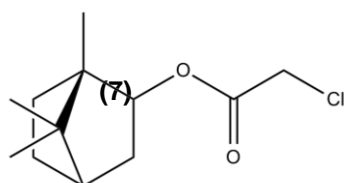
(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl pivalate



Isovaleroato de bornila (11)

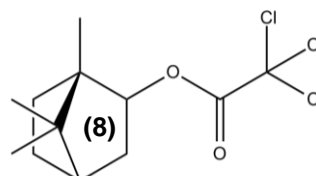
(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl 3-methylbutanoate

(6)



Cloroacetato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl 2-chloroacetate



Tricloroacetato de bornila

(1S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl 2,2,2-trichloroacetate

(9)

(10)

4.3 PROCEDIMENTOS PARA TESTES LARVICIDAS

4.3.1 Produção das larvas

Os ovos de *Ae. aegypti* foram produzidos em insetário e mantidos secos aderidos a tiras de papel até o uso, utilizou-se larvas da linhagem Rockefeller do *Ae. aegypti*. Ovos desta espécie podem ser mantidos assim no laboratório por aproximadamente quatro meses, sem perda da viabilidade. Uma quantidade adequada de tiras de papel com os ovos é colocada em um recipiente retangular com água mineral tendo como fonte de alimento ração de gato triturada. O recipiente foi mantido no insetário, com temperatura controlada (26 ± 2 °C) em fotoperíodo de 12h mimetizando as condições do seu habitat. A eclosão e o desenvolvimento das larvas acontecem aproximadamente em quatro dias, quando larvas de terceiro estágio foram coletadas. As larvas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe. O procedimento para manutenção dos mosquitos na colônia foi submetido ao Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da UFS e aprovado sob o número 95/2011 da Universidade Federal de Sergipe e está em concordância com os aspectos éticos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

4.3.2 Preparo da solução-estoque

Para o preparo de 1 mL de solução-estoque, pesou-se 20 mg de composto em balança analítica semi-micro. Em seguida, adicionou-se duas gotas de agente tensoativo Tween 80, seguido por homogeneização. Com auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 300 µL (30% v/v) de DMSO. Por fim, adicionou-se 700 µL (70% v/v) de água mineral e homogeneizou-se novamente. A partir da soluções-estoque foram preparadas uma série de diluições variando de 10 a 1000 ppm.

4.3.3 Realização do teste larvicida

Os ensaios larvicidas foram realizados conforme metodologia descrita por Santos *et al.* (2011). No primeiro momento foi realizado o ensaio piloto que consiste em testar o composto nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 ppm avaliando a faixa de mortalidade após 24h.

Com os dados da mortalidade do ensaio piloto planejou-se as concentrações que foram testadas, e a quantidade de solução estoque necessária para o teste que é realizado em triplicata. A partir da bandeja contendo número suficiente de larvas em estágio L3, foram transferidas 20 larvas para uma proveta de 50 mL com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico com a ponta cortada para evitar morte por trauma. O volume de água é completado pra 20 mL e em seguida transferido para copos descartáveis, este procedimento foi repetido até o número de copos ser suficiente para o teste mais o controle positivo e negativo (figura 11).

A quantidade desejada de solução estoque foi aplicada em copos descartáveis de 100 mL com o auxílio de micropipetas automáticas, sendo pré-solubilizados em água desclorada onde em seguida as verteu-se lentamente as larvas contidas na proveta de 50 mL, evitando a morte das mesmas por agitação vigorosa ou pela presença de altas concentrações momentâneas da solução estoque. Os testes foram realizados da menor para a maior concentração, em triplicata, assim como o controle positivo e negativo. O controle positivo foi realizado com 0,04% de Temefós em Tween 80 e DMSO em água desclorada, e o controle negativo com Tween 80, DMSO e água desclorada na máxima concentração utilizada no teste larvicida. As larvas são expostas ao composto por 24 horas e, ao final deste período, registrou-se a taxa de mortalidade.



Figura 11: Ensaio larvicida.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados de mortalidade obtidos nos ensaios, foi realizada a estimativa da concentração letal que mata 50% da população (CL_{50}) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%), utilizando o método de análise *Probit* com o auxílio do software Minitab 16™ (Finney, 1971). Em caso de ocorrer morte no ensaio controle entre 5 e 20%, deverá ser realizada a correção utilizando a formula de Abbott's (equação 6) (Abbott, 1925).

$$\% \text{ Mortos} = [1 - (\text{teste}/\text{controle})] \cdot 100 \quad (6)$$

4.5 ESTUDO DE QSAR

O composto mãe, (-)-borneol, e seus doze derivados sintéticos tiveram suas conformações geométricas, energéticas e termodinâmicas otimizadas pelo programa Gamess interface Chem3D Ultra 7.0 e, a partir deste, foram calculados através do mesmo programa 40 descritores estruturais.

As moléculas tiveram suas conformações otimizadas pois em química medicinal considera-se que as conformações mais estáveis são aquelas que se ligam biologicamente ao seu receptor, provocando o efeito farmacológico (Neto *et al.*, 2006).

Estes 40 descritores foram correlacionados com a atividade larvícida expressa em potência ($\log 1/CL_{50}$) e dentre eles foram selecionados somente os que obtiveram o índice de determinação (r^2) maior que 0,80, que segundo Kubinyi (1994) já são considerados bons modelos de QSAR.

As correlações dos descritores e a plotagem da curva de regressão linear foram feitas através do programa Minitab16™ onde este forneceu o valor do índice de determinação (r^2) e também o valor do desvio padrão (s). O índice Q, ou fator de qualidade. “F” ou valor estatístico de Fischer também foi obtido através do mesmo software (Oliveira *et al.*, 2014).

Os valores de índice de correlação cruzada (q^2) foram obtidos pelo método “*Leave One Out*” que consiste em dividir o conjunto total de dados em diversos subconjuntos onde um dado é excluído e então predito pelo modelo

calculado. A análise da variância dos erros encontrados mede a capacidade do modelo em representar o processo gerador de dados, no caso, a equação de QSAR. O “ q^2 ” mede a qualidade do modelo de QSAR, modelos satisfatórios apresentam $q^2 > 0,5$ e $r^2 > 0,8$. Altos valores de Q e F indicam alto poder preditivo do QSAR.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS

A metodologia descrita foi efetiva para a síntese dos derivados do (-) - borneol e tiveram rendimento variando de 29,4% a 79,9%. Diferentemente do (-)borneol, que é um sólido cristalino, os derivados ésteres são todos líquidos a temperatura ambiente, sendo que alguns ainda mantém semelhante odor agradável, característico do (-)-borneol.

A análise feita por espectroscopia de Infravermelho (IR) dos compostos alifáticos confirmaram a presença do produto proposto pela presença de bandas de absorção entre a faixa de $1750 - 1740 \text{ cm}^{-1}$ (deformação axial de C=O de éster); e uma outra banda entre $1300 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ (deformação axial e angular de C-O de éster saturado).

No composto aromático (**8**) foi observado bandas em 1718 cm^{-1} (C=O de éster) e bandas em 1274 cm^{-1} e 1116 cm^{-1} (C-O de ésteres aromáticos). Em todos os casos a ausência de banda estreita e intensa característico do estiramento axial da hidroxila na região do $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ é mais uma evidência que as reações foram realizadas com sucesso.

Na espectrometria de massas o pico de m/z : $[M+Na]^+$ teve grande intensidade em todos espectros obtidos, os picos de m/z : $[M+H]$ estão presentes porém em baixa intensidade não sendo possível quantificá-lo com precisão.

A reação de esterificação do (-) borneol acontece em duas etapas (figura 12): na primeira etapa ocorre a ressonância da carbonila do cloreto de ácido deixando o carbono parcialmente positivo, o par de elétrons livre do oxigênio

alcoólico do borneol realiza o ataque nucleofílico neste carbono formando o intermediário tetraédrico. Na segunda etapa o oxigênio retoma a dupla ligação com o carbono eliminando o cloreto (grupo de saída), formando o éster. O DMAP catalisa a reação auxiliando na retirada do próton ligado ao oxigênio do borneol.

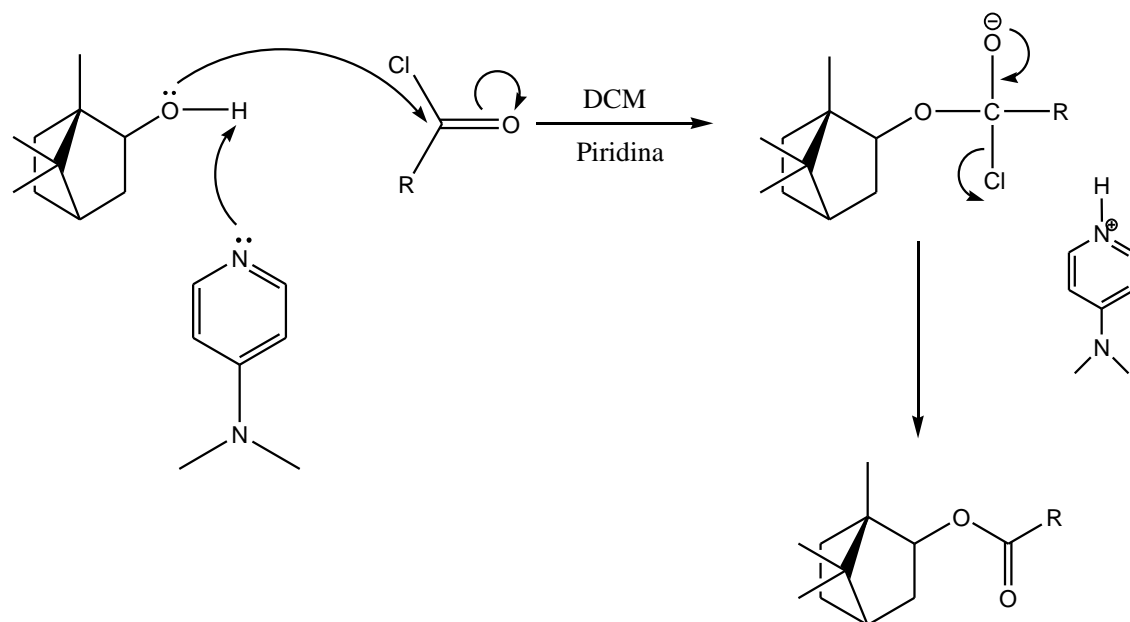


Figura 12: Mecanismo da reação

5.2 ATIVIDADE LARVICIDA

Os valores de CL_{50} obtidos do ensaio de atividade larvicidas (Tabela 2) demonstraram que a maioria dos derivados (à exceção do composto **(7)** que mostrou-se inativo), possuem alguma toxicidade contra as larvas do *Ae. aegypti* após 24h de exposição.

Os valores de CL_{50} variaram de 21 a 476 ppm, analisando a cadeia lateral dos compostos sintetizados pode-se correlaciona-las com a CL_{50} para avaliar o efeito da esterificação no aumento da potência da atividade larvicida através do estudo de Relação Estrutura-Atividade, ou *Structure-Activity*

Tabela 2: Atividade larvicida do borneol e seus derivados frente as larvas do *Ae. aegypti*.

COMPOSTOS	CL_{50} ppm (IC 95%)	CL_{95} ppm	Log (1/CL_{50})
Borneol (1)	254 (225 a 285)	395	2,78252
Acetato de bornila (2)	250 (222 a 289)	434	2,89620
Propanoato de bornila (3)	103 (96 a 110)	200	3,30980
Butanoato de bornila (4)	239 (219 a 259)	497	2,97469
Pentanoato de bornila (5)	166 (146 a 190)	517	3,16115
Hexanoato de bornila (6)	476 (430 a 531)	1158	2,72446
Heptanoato de bornila (7)	6725 (2214 a 226819)	133835	1,59787
Benzoato de bornila (8)	106 (95 a 119)	281	3,38722
Isobutirato de bornila (9)	98 (91 a 107)	195	3,38722
Pivaloato de bornila (10)	107 (105 a 119)	396	3,34679
Isovaleroato de bornila (11)	182 (171 a 191)	267	3,11919
Cloroacetato de bornila (12)	21 (19 a 22)	45	4,04576
Tricloroacetato de bornila (13)	103 (93 a 115)	271	3,46852

Relationship (SAR) conforme descrito a seguir.

5.3 SAR

Os derivados **(2)**, **(3)**, **(4)** e **(5)** possuíram maior atividade larvica que o borneol, demonstrando que a esterificação da hidroxila deste monoterpene é favorável ao aumento desta atividade. No derivado **(2)**, com apenas dois carbonos a mais, não houve melhora significativa da atividade larvica, onde os IC 95% dos dois compostos se sobrepõem, o que sugere uma possível hidrólise do éster na larva, convertendo a molécula sintetizada **(2)** em borneol **(1)**.

A partir da atividade de **(4)** podemos sugerir que o mesmo fenômeno citado anteriormente para o composto **(2)** também acontece, possivelmente pelo mecanismo das acetil e butil esterases inespecíficas do organismo da larva.

O genoma do *Ae. aegypti* codifica 253 genes da família do citocromo P450, glutathione transferase e carboxi/colinesterases (CCE), que são os mecanismos de detoxificação do inseto. Destes, 49 genes são pertencentes ao grupo das CCE, esta família é caracterizada pela presença de α/β hidrolases que representam enzimas catalíticas e não catalíticas envolvidas no desenvolvimento e transmissão neuronal (Strode *et al.*, 2008; Chaskopoulou *et al.*, 2009).

Entretanto os derivados **(3)** e **(5)** apresentaram maior atividade larvica do que o composto líder **(1)**, o que sugere baixa afinidade enzimática pelas CCE tendo conseqüentemente baixa hidrólise por estas. Possivelmente também ocorra melhor encaixe com o receptor alvo envolvido, sendo que, o composto **(3)** tem maior atividade que **(5)** devido a diferença de tamanho da cadeia linear e demais propriedades físico-químicas envolvidas que serão discutidas a frente.

Neste mesmo raciocínio observamos os valores de CL₅₀ de **(8)**, **(9)**, **(10)** e **(13)** que estão aproximadamente em 100 ppm. Estas similaridades na

atividade larvícida reforçam a hipótese de que ocorre uma interação hidrofóbica favorável entre a cadeia lateral do éster sintetizado com as proteínas da larva do *Ae. aegypti*.

Esta interação hidrofóbica parece ser dependente do tamanho e volume da cadeia lateral do éster. Apesar de **(10)** e **(11)** serem isômeros estruturais, suas CL_{50} foram de 107 ppm e 182 ppm respectivamente.

Já os compostos **(6)** e **(7)** apresentaram menor atividade que o borneol, sendo que o composto **(7)** demonstrou-se inativo ($CL_{50} > 1000$ ppm). Por apresentarem uma cadeia lateral longa, possivelmente ocorre impedimento estérico no encaixe com os sítios biológicos envolvidos na larva.

Portanto, conforme discutido na diferença da atividade **(3)** e **(5)**, entre **(10)** e **(11)**, e pela redução da atividade em **(6)** e **(7)**, sugere-se que há um tamanho e volume de cadeia limitante para que ocorra interação necessária para exercer a atividade larvícida ótima para os derivados do borneol.

Para os compostos clorados **(12)** e **(13)**, os valores de CL_{50} foram 21 e 103 ppm respectivamente. A partir da CL_{50} da molécula **(13)** podemos supor que esta possui o mesmo princípio apresentado para os compostos **(8)**, **(9)** e **(10)**. Neste trabalho, o derivado **(12)** foi o que apresentou a melhor atividade larvícida entre todos os compostos sintetizados.

Quando larvas de culicídeos estão em condições normais em água limpa, a eliminação e receptação de íons é realizada via papila anal. Em experimentos realizados a partir de extratos etanólicos de *Piper spp*, verificou-se através de microscopia eletrônica um dano severo na cutícula da papila anal, que é responsável por manter o equilíbrio osmótico da larva (Chaithong *et*

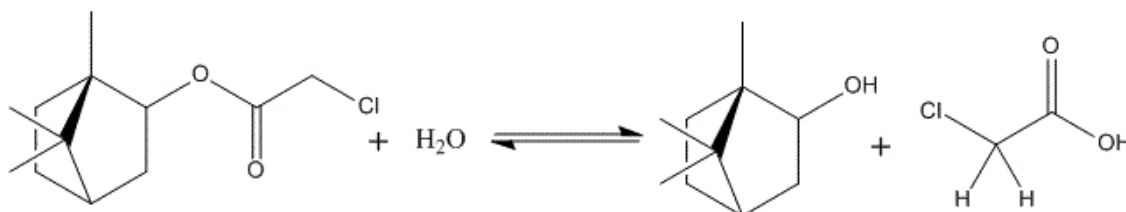


Figura 13: Hidrólise do cloroacetato de bornila em borneol e íon cloroacetato

al., 2006).

Com a destruição desta papila ocorre a diminuição ou incapacidade da larva de captar íons sódio, potássio, cálcio e cloreto do meio, causando sua morte (Chaithong *et al.*, 2006). Além deste dano, simultaneamente ocorre hidrólise do cloroacetato de bornila em borneol e íon cloroacetato (Figura 12).

Ácidos carboxílicos que possuem substituintes eletronegativos ou halogenados, como o cloro por exemplo, tem sua acidez elevada, especialmente quando ligados ao carbono α (C_α). Essa elevação da acidez se deve ao efeito indutivo proveniente do átomo eletronegativo que é transmitido através das ligações σ da molécula.

Os elétrons da ligação σ entre o Cl e o C_α do íon cloroacetato são atraídos na direção do Cl, com a deficiência de elétrons do C_α este fica parcialmente positivo. Por consequência desta carga positiva o C_α atrai os elétrons do carboxilato carregado negativamente, dispersando assim a carga e estabilizando o ânion (Figura 14). A múltipla substituição de halogênios aumenta ainda mais a acidez destes compostos, por exemplo, o pK_a do ácido cloroacético é 2,9 enquanto o do ácido tricloroacético é de 0,9 (Solomons e Fryhle, 2008).

Neste contexto, é possível deduzir a partir das atividades obtidas dos compostos **(12)** e **(13)** que somente o **(12)** pode possuir atividade larvívica adicional resultante de sua hidrólise, porque se em **(13)** ocorresse este mesmo efeito, o valor da CL_{50} de **(13)** seria igual ou menor do que **(12)**.

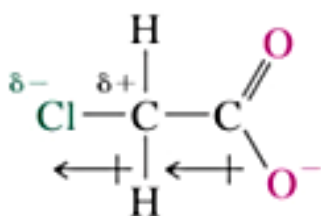


Figura 14: Ânion cloroacetato estabilizado pelo efeito retirador de elétrons do cloro (Solomons & Fryhle, 2008).

5.4 QSAR

Os valores de CL_{50} e os 40 descritores estruturais obtidos a partir do software GAMESS foram submetidos a análise de regressão linear múltipla no software Minitab16. Observando a dispersão dos pontos no gráfico constatou-se que estes exibem o modelo parabólico de Hansch (Figura 15) (Tavares, 2004)



Figura 15: Modelo parabólico de Hansch (Tavares, 2008)

Sendo assim, a análise estatística seguiu o modelo quadrático de regressão, portanto um dos termos é elevado ao quadrado, resultando em uma equação de segundo grau. Os descritores com $r^2 > 0,8$ foram avaliados, os mais relevantes estatisticamente estão presentes na tabela 3.

O grau de determinação entre os descritores escolhidos foi realizado através do software Minitab 16 (Figura 16). Os valores obtidos através das correlações foram acima de 80% ($r > 0,8$), o que significa que estes descritores

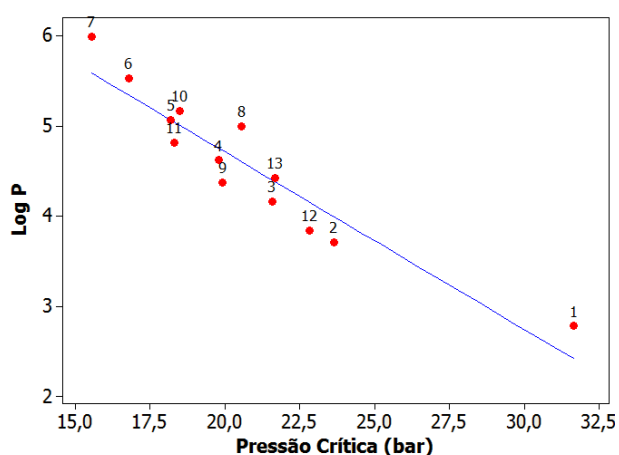


Figura 16: Correlação de duas variáveis: Log P x Pressão Crítica, $r^2 = 0,889$.

influem de maneira muito semelhante nesta série de derivados (Ferreira, 2002).

Nestes casos não há necessidade de equações com mais de um descritor envolvido já que todos exercem estatisticamente a mesma influência sobre a variável dependente.

Tabela 3: Descritores estruturais mais relevantes no estudo do QSAR da atividade larvica do borneol frente larvas de *Ae. aegypti*.

Compostos	$\log(1/CL_{50})$	Log P	Pressão Crítica (P_C) [bar]	Refratividade Molar (RM) [cm ³ /mol]	Área Molecular de Connolly (AMC)	Capacidade térmica de gás ideal (CTGI) [J/(mol.K)]
<i>Borneol (1)</i>	2,78252	2,78	31,6683	45,31	167,558	198,37
<i>Acetato de bornila (2)</i>	2,89620	3,71	23,6567	54,66	208,768	247,13
<i>Propanoato de bornila (3)</i>	3,30980	4,16	21,5931	59,40	227,574	270,06
<i>Butanoato de bornila (4)</i>	2,97469	4,62	19,7882	64,00	246,725	292,99
<i>Pentanoato de bornila (5)</i>	3,16115	5,07	18,2006	68,60	262,725	315,92
<i>Hexanoato de bornila (6)</i>	2,72446	5,53	16,7966	73,20	279,093	338,85
<i>Heptanoato de bornila (7)</i>	1,59787	5,99	15,5490	77,80	294,425	361,78
<i>Benzoato de bornila (8)</i>	3,38722	5,00	20,5676	74,79	258,42	301,91
<i>Isobutirato de bornila (9)</i>	3,38722	4,37	19,9298	64,32	238,512	293,50
<i>Pivaloato de bornila (10)</i>	3,34679	5,17	18,4992	68,87	251,215	315,49
<i>Isovaleroato de bornila (11)</i>	3,11919	4,82	18,3254	68,78	258,563	316,43
<i>Cloroacetato de bornila (12)</i>	4,04576	3,84	22,8277	59,99	224,473	260,50
<i>Tricloroacetato de bornila (13)</i>	3,46852	4,42	21,6736	68,71	247,259	286,82

A lipofilicidade é um parâmetro que parece ter importante papel na atividade larvica de monoterpenos (Santos *et al.*, 2011). Este efeito se dá provavelmente pelo aumento da absorção transmembrana promovida pelos terpenos, tanto de drogas lipofílicas quanto de drogas hidrofílicas (Simas, 2004).

Com objetivo de avaliar estas contribuições, o Log P foi selecionado como descritor inicial para estudo do QSAR deste trabalho, o gráfico de regressão linear entre os valores da atividade larvica expressa em potência ($\log 1/CL_{50}$) e o coeficiente de partição ($\log P$) é apresentado na figura 16.

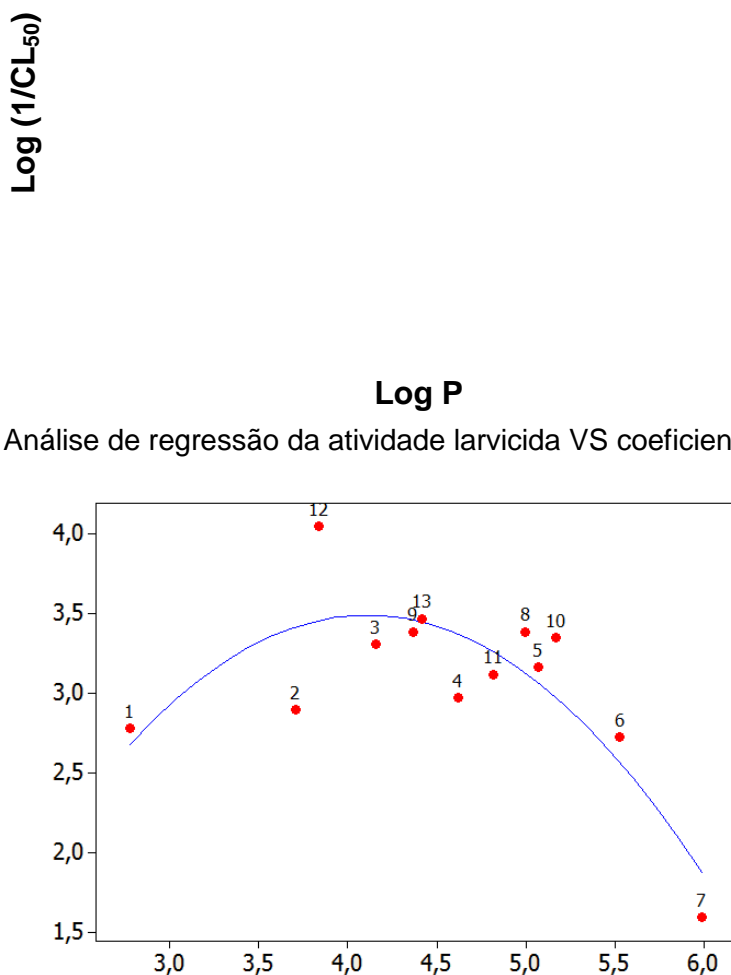


Figura 17: Análise de regressão da atividade larvica VS coeficiente de partição

O gráfico obtido na figura 17 gerou a equação 7, os indicadores de qualidade obtidos demonstraram que este modelo não é válido apesar de

prever 70% das variações da atividade biológica observadas ($r^2 = 0,700$), bons modelos devem possuir $r^2 > 0,800$ (Gaudio, 2001).

$$\log(1/CL_{50}) = -0,4573 (\log P)^2 + 3,759 (\log P) - 4,236$$

$$n = 13; s = 0,3401; r^2 = 0,700; F = 11,68; q^2 = 0,1845; S_{PRESS} = 0,1613$$

Onde:

$\log(1/CL_{50})$ = atividade larvícida expressa em potência (1/mmol);

$\log P$ = logaritmo do coeficiente de partição teórico 1-octanol/água (pH = 7,4);

n = número de compostos utilizados no cálculo da regressão linear;

s = desvio padrão;

r^2 = índice de determinação;

F = valor estatístico de Fischer;

q^2 = índice de correlação cruzada;

S_{PRESS} = desvio padrão da correlação cruzada.

A correlação cruzada calculada através do método *Leave one out* obteve baixo valor de q^2 (mais próximo de 0 do que de 1), que indica (7) previsibilidade do modelo, o que também é confirmado pelo alto valor do desvio padrão S_{PRESS} .

Três compostos não tiveram uma relação estrutura-atividade compatível com um modelo previsível (figura 17), o que foi indicado através do estudo de SAR. Estes compostos foram considerados “*outliers*” e retirados da série para recalcular a equação 7, de modo a obter índices de determinação satisfatórios (r^2) com alto valor preditivo.

Destes, foi considerado *outlier* o composto **(12)**, por ter um mecanismo diferenciado, conforme discutido em **5.3** a atividade deste derivado não é explicada somente a partir das suas propriedades físico-químicas. O (-)-borneol **(1)**, ou composto mãe da série, também foi considerado *outlier*, apesar de dar origem a série, a hidroxila presente nesta molécula confere um caráter lipofílico diferenciado quando comparado com seus derivados ésteres.

Esta diferença de polaridade entre o borneol **(1)** e seus derivados causa um grande intervalo nos pontos no gráfico da figura 17, esta distância causa prejuízos na qualidade do modelo obtido. Seria necessário sintetizar mais compostos derivados do borneol com log P entre 2,78 ($\log P_{(1)}$) e 3,71 ($\log P_{(2)}$) para consolidar **(1)** no modelo proposto, no entanto o derivado **(2)** já é o que possui menor número de carbonos, o que impossibilitou esta verificação neste trabalho.

O butanoato de bornila **(4)** apresentou atividade larvica menor do que o esperado, provavelmente por algum mecanismo de resistência da larva. Como a CL_{50} observada em **(4)** sugere que há outros fatores desconhecidos influenciando, este derivado foi considerado *outlier* e a equação 7 de QSAR recalculada.

Com a retirada dos compostos **(1)**, **(4)** e **(12)** que compõem a série homóloga, obteve-se a curva de regressão linear da atividade ($\log CL_{50}$) VS coeficiente de partição ($\log P$) (figura 18), resultando na equação 8 e demais indicadores de qualidade.

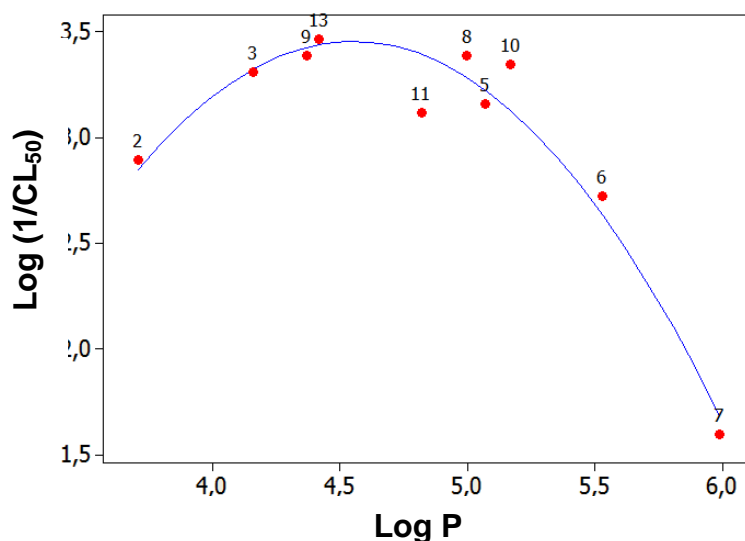


Figura 18: Análise de regressão da atividade larvica VS coeficiente de partição sem compostos *outliers*

$$\log(1/CL_{50}) = -0,8571 (\log P)^2 + 7,804 (\log P) - 14,31 \quad (8)$$

$$n = 10; s = 0,150352; r^2 = 0,944; F = 58,71; q^2 = 0,8442; S_{PRESS} = 0,0827$$

Onde:

$\log(1/CL_{50})$ = atividade larvícida expressa em potência (1/mmol);

$\log P$ = logaritmo do coeficiente de partição teórico 1-octanol/água (pH =7,4);

n = número de compostos utilizados no cálculo da regressão linear;

s = desvio padrão;

r^2 = índice de determinação;

F = valor estatístico de Fischer;

q^2 = índice de correlação cruzada;

S_{PRESS} = desvio padrão da correlação cruzada.

A equação 8 demonstrou excelentes indicadores estatísticos. A remoção destas moléculas resultou em um índice de determinação (r^2) capaz de explicar 94,4% da variabilidade biológica observada.

A significância estatística de r^2 foi testada aplicando-se o teste de hipótese conhecido como teste F. Este teste baseia-se na comparação do valor de F obtido com o valor de referência. O valor de F das equações 7 e 8 foram fornecidas pelo próprio software.

Os valores de referência de F são obtidos através de tabelas específicas, onde $F = [k, n-k-1] = F[1, 8] = 5,32$ para 95% de confiança ($p = 0,05$), onde k é a quantidade de descritores ($k = 1$) e n representa o número de compostos ($n = 10$).

O valor de F na equação 8 ($F=58,71$) é maior que o de referência ($F=5,32$), representando 95% de confiança do modelo. No entanto, o valor de F obtido é muito maior do que F de referência, ou seja, o nível de significância também é muito maior do que 95%. Como o valor de $p < 0,001$, existe pelo menos 99,9% de significância real deste modelo.

Além disso, a análise de correlação cruzada (q^2), reafirma que a equação 8 pode ser utilizada para prever a atividade larvícida de outros compostos derivados de borneol, pois conseguiu apresentar um valor próximo

de 1, assim como teve seus indicadores de qualidade S_{PRESS} e F expressivamente melhorados.

Assim pôde-se observar o Log P ideal para os compostos derivados do borneol. Os resultados sugerem que moléculas com Log P por volta de 4,5 possuem características ótimas no tocante a atividade larvicida contra o *Ae. aegypti*. Esta atividade observada se deve por razões farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas de mecanismos ainda não elucidados completamente.

6. CONCLUSÃO

- Todas as moléculas propostas foram sintetizadas com sucesso, o que pode-se comprovar através das técnicas de caracterização como IR, EM, RMN ^1H e RMN ^{13}C . A síntese demonstrou ser de fácil execução, assim como sua purificação em CC;
- Através das modificações sintéticas realizadas no (-)- borneol, foi possível aumentar a potência da atividade larvicida, sendo o derivado **(12)** o mais potente da série, apresentando CL_{50} de 21 ppm;
- Identificou-se um tamanho máximo de cadeia do éster para a toxicidade contra as larvas do *Ae. aegypti*. Sendo que cadeias grandes como a dos compostos **(6)** e **(7)** diminuíram a atividade, enquanto todos os outros aumentaram, em maior ou menor intensidade. Confirmando a influência da lipofilia na atividade larvicida;
- A equação 8 obtida no QSAR foi de excelente qualidade segundo os índices avaliadores de r^2 , q^2 , s e S_{PRESS} . Demonstrando ser eficaz para prever a atividade de derivados do (-)-borneol;
- O modelo parabólico obtido sugere que as moléculas com Log P de aproximadamente 4,5 tem sua atividade otimizada. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados como base para direcionar o planejamento de candidatos a novos agentes larvicidas.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economical Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

AITKEN, T. *et al.* Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 1, p. 119-121, 1979. ISSN 0002-9637.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. Quantum chemical properties used in structure-activity relationship studies. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010. ISSN 0100-4042.

AZEVEDO RDO, S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 58, 2015. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26398876> >.

BASAK, S. *et al.* Quantitative structure-activity relationship modeling of insect juvenile hormone activity of 2, 4-dienoates using computed molecular descriptors. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 16, n. 6, p. 581-606, 2005. ISSN 1062-936X.

BELINATO, T. A.; VALLE, D. The Impact of Selection with Diflubenzuron, a Chitin Synthesis Inhibitor, on the Fitness of Two Brazilian *Aedes aegypti* Field Populations. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130719, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26107715> >.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007. ISSN 1679-4974.

BRASIL, P. *et al.* Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro—preliminary report. **New England Journal of Medicine**, 2016. ISSN 0028-4793.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume 46 N° 03. 2015a. ISSN: 2358-9450. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at--SE-53.pdf> >.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume 46 N° 36 2015c ISSN: 2358-9450. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/26/2015-dengue-SE45.pdf> >

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume 47 N° 03. 2016a ISSN: 2358-9450. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf> >.

BRASIL. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública Sobre Microcefalias (COES) Informe Epidemiológico nº 30. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2016c Disponível em: < http://combateaes.saude.gov.br/images/boletins-epidemiologicos/informe_microcefalia_epidemiologico30.pdf <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/17/2016-019.pdf>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf >.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/preparacao_resposta_virus_chikungunya_brasil.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015b. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigil-ncia-e-resposta---vers--o-1---09dez2015-8h.pdf>>

BRASIL.. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume 47 N° 25. 2016b ISSN: 2358-9450. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/17/2016-019.pdf> >.

BRITO, C. Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. **Acta Medica Portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 679-80, Nov-Dec 2015. ISSN 1646-0758 (Electronic) 0870-399X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26849748> >.

BROTO, P.; MOREAU, G.; VANDYCKE, C. Molecular structures: perception, autocorrelation descriptor and sar studies: system of atomic contributions for the calculation of the n-octanol/water partition coefficients. **European journal of medicinal chemistry**, v. 19, n. 1, p. 71-78, 1984. ISSN 0223-5234.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885-6, Oct 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401719> >.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085-6, Jun 2014. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856001> >.

CARVALHO, A. F. U. *et al.* Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003. ISSN 0074-0276.

CAUCHEMEZ, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125-2132, 2016. ISSN 0140-6736.

CETIN, H.; YANIKOGLU, A.; CILEK, J. E. Larvicidal activity of selected plant hydrodistillate extracts against the house mosquito, *Culex pipiens*, a West Nile virus vector. **Parasitology research**, v. 108, n. 4, p. 943-948, 2011. ISSN 0932-0113.

CHAITHONG, U. *et al.* Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 138-44, Jun 2006. ISSN 1081-1710 (Print) 1081-1710 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859102> >.

CHASKOPOULOU, A. *et al.* Toxicities of 31 volatile low molecular weight compounds against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 2, p. 328-34, Mar 2009. ISSN 0022-2585 (Print) 0022-2585 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351084> >.

COSTELLO, A. *et al.* Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 6, p. 406-406A, 2016. ISSN 0042-9686.

CROTEAU, R.; KARP, F. Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 184, n. 1, p. 77-86, 1977. ISSN 0003-9861.

CRUNKHORN, S. Antiviral drugs: Novel antibodies defeat dengue virus. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 601, Sep 2015. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26272188> >.

DA SILVA-VOORHAM, J. M. *et al.* [Dengue: a growing risk to travellers to tropical and sub-tropical regions]. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 153, p. A778, 2009. ISSN 1876-8784 (Electronic) 0028-2162 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025792> >.

DEVILLERS, J. *et al.* In silico models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 25, n. 10, p. 805-35, 2014. ISSN 1029-046X (Electronic) 1026-776X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275884> >.

DEVLIN, F.; STEPHENS, P.; BESSE, P. Conformational rigidification via derivatization facilitates the determination of absolute configuration using chiroptical spectroscopy: A case study of the chiral alcohol endo-borneol. **The Journal of organic chemistry**, v. 70, n. 8, p. 2980-2993, 2005. ISSN 0022-3263.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology research**, v. 113, n. 2, p. 565-592, 2014. ISSN 0932-0113.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-5, Jan-Mar 2015. ISSN 1980-5497 (Electronic) 1415-790X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651028> >.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002. ISSN 1415-790X.

DRIGGERS, R. W. *et al.* Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142-2151, 2016. ISSN 0028-4793.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 11 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034> >.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis: 3d Ed.** Cambridge University Press, 1971.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde. 3ª Edição revisada. 75p; 2001. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf >

GARCEZ, W. S. *et al.* Substâncias de origem vegetal com atividade larvicide contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013. ISSN 1984-6835.

GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposition, validation and analysis of QSAR models. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 658-671, 2001. ISSN 0100-4042.

GRODNITZKY, J. A.; COATS, J. R. QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4576-4580, 2002. ISSN 0021-8561.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665979> >.

HALES, S. *et al.* Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. **Lancet**, v. 360, n. 9336, p. 830-4, Sep 14 2002. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12243917> >.

HAMMETT, L. P. The effect of structure upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 59, n. 1, p. 96-103, 1937. ISSN 0002-7863.

HANSCH, C.; VERMA, R. P. Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: A QSAR study. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 1, p. 260-273, 2009. ISSN 0223-5234.

JENTES, E. S. *et al.* The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 622-32, Aug 2011. ISSN 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798462> >.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KRAEMER, M. U. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, v. 4, p. e08347, 2015. ISSN 2050-084X (Electronic) 2050-084X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126267> >.

KUBINYI, H. *et al.* Methods and principles in medicinal chemistry. **Mannhold, R. et al., eds**, 1993.

LAU, K. W. *et al.* Evaluation of Insect Growth Regulators Against Field-Collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 2, p. 199-206, Mar 2015. ISSN 0022-2585 (Print) 0022-2585 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336304> >.

LI, C. *et al.* Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell stem cell**, 2016. ISSN 1934-5909.

LIESCH, J.; BELLANI, L. L.; VOSSHALL, L. B. Functional and genetic characterization of neuropeptide Y-like receptors in *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2486, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130914> >.

LÓPEZ, M.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284-288, 2010. ISSN 0926-6690.

LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 43-54, Jan 2004. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14702837> >.

LUO, X. L. *et al.* Simple method for determination of five terpenoids from different parts of *Tripterygium wilfordii* and its preparations by HPLC coupled with evaporative light scattering detection. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 9, p. 1284-91, Jun 2007. ISSN 1615-9306 (Print) 1615-9306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623469> >.

MACORIS, M. D. L. D. G. Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) a inseticidas. Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

MARLES, R. J. *et al.* Thiophenes as mosquito larvicides: structure-toxicity relationship analysis. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 41, n. 1, p. 89-100, 1991. ISSN 0048-3575.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. QSAR modeling: a new open source computational package to generate and validate QSAR models. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 554-560, 2013. ISSN 0100-4042.

MATOS, R. A. F.; ANDRADE, C. K. Z. Synthesis of new chiral ionic liquids based on (-)-menthol and (-)-borneol. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 10, p. 1652-1655, 2008. ISSN 0040-4039.

MLAKAR, J. *et al.* Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016. ISSN 0028-4793.

MONTELLA, I. R. *et al.* Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-77, Sep 2007. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827362> >.

MOURYA, D. Absence of transovarial transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. **Indian journal of medical research**, v. 85, p. 593-595, 1987. ISSN 0019-5340.

MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. **American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 269-73, Jun 1995. ISSN 8756-971X (Print) 8756-971X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595460> >.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 198-201, 2007. ISSN 0960-8524.

NETO, Q. A. L. *et al.* Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 2006.

NUNES, M. R. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, p. 102, 2015. ISSN 1741-7015 (Electronic) 1741-7015 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25976325> >.

OLIVEIRA MELO, A. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016. ISSN 1469-0705.

OLIVEIRA, R.B. *et al.* Synthesis, Activity, and QSAR Studies of Tryptamine Derivatives on Third-instar Larvae of *Aedes Aegypti* Linn. **Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 580-587, 2014. ISSN 1573-4064.

OPAS. 2015. Organização Pan Americana de Saúde, Alerta Epidemiológica Infección por virus Zika, 7 de maio de 2015. Disponível em: < http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=&gid=30076&lang=es >

PALCHICK, S. Chemical control of vectors. **The Biology of the Disease Vectors, University Press of Colorado, Colorado**, p. 502-511, 1996.

PANDEY, S. K. *et al.* Structure–activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest management science**, v. 69, n. 11, p. 1235-1238, 2013. ISSN 1526-4998.

PAVELA, R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 311-315, 2009. ISSN 0926-6690.

PICOLLO, M. *et al.* Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. **Fitoterapia**, v. 79, n. 4, p. 271-278, 2008. ISSN 0367-326X.

PINTO JUNIOR, V. L. *et al.* Vírus Zika: revisão para clínicos. **Acta Medica Portuguesa** 2015. ISSN 0870-399X. Disponível em: < <http://arca.icict.fiocruz.br/bitstream/icict/13670/2/V%C3%ADrus%20Zika%20-%20Revis%C3%A3o%20para%20Cl%C3%ADnicos.pdf> >

PITAROKILI, D. *et al.* Chemical composition, larvicidal evaluation, and adult repellency of endemic *Greek Thymus* essential oils against the mosquito vector of West Nile virus. **Parasitology research**, v. 109, n. 2, p. 425-430, 2011. ISSN 0932-0113.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Treatment of dengue fever. **Infection and Drug Resistance**, v. 5, p. 103-12, 2012. ISSN 1178-6973 (Electronic) 1178-6973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870039> >.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam.(Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn.(Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, n. 2, p. 107-109, 2010. ISSN 1226-8615.

RASMUSSEN, S. A. *et al.* Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016. ISSN 0028-4793.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop protection**, v. 29, n. 9, p. 913-920, 2010. ISSN 0261-2194.

RODRIGUES, A. *et al.* Larvicidal activity of *Cybastax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 755-757, 2005. ISSN 0367-326X.

ROSEN, L. *et al.* Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 32, n. 5, p. 1108-1119, 1983. ISSN 0002-9637.

SANTOS, S. R. *et al.* Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150-3, Jun 2011. ISSN 1879-1298 (Electronic) 0045-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376365> >.

SHAN, C. *et al.* Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. **ACS Infectious Diseases**, 2016. ISSN 2373-8227.

SILVA-FILHO, J. C. *et al.* Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171-7, Feb 2012. ISSN 1742-7843 (Electronic) 1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883938> >.

SIMAS, N. K. *et al.* Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SIMMONS, C. P. *et al.* Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-32, Apr 12 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494122> >.

SONG, X. *et al.* Synthesis, larvicidal, QSAR and structural studies of some triorganotin 2, 2, 3, 3-tetramethylcyclopropanecarboxylates. **Applied organometallic chemistry**, v. 21, n. 7, p. 545-550, 2007. ISSN 1099-0739.

STRODE, C. *et al.* Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 113-23, Jan 2008. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070670> >.

SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 136-73, Jan 2004. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726459> >.

TANG, H. *et al.* Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell stem cell**, v. 18, n. 5, p. 587-590, 2016. ISSN 1934-5909.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004. ISSN 0100-4042.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Molecular Descriptors for Chemoinformatics, Volume 41 (2 Volume Set)**. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 3527628770.

VERMA, R. P.; HANSCH, C. An approach toward the problem of outliers in QSAR. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 15, p. 4597-4621, 2005. ISSN 0968-0896.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: a systematic review. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240-56, Jun 2013. ISSN 1980-5497 (Electronic) 1415-790X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141998> >.

WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2921, Jun 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967777> >.

WHO World Health Organization. WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. **Saudi Medical Journal**, v. 37, n. 3, p. 334, 2016. ISSN 1658-3175.

ZHU, L.; TIAN, Y. Chemical composition and larvicidal activity of *Blumea densiflora* essential oils against *Anopheles anthropophagus*: a malarial vector mosquito. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1417-1422, 2011. ISSN 0932-0113.

ZHU, L.; TIAN, Y.-J. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Blumea martiniana* against *Anopheles anthropophagus*. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, n. 5, p. 371-374, 2011. ISSN 1995-764